

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES DE SYSTÉMATIQUE BACTÉRIENNE

VI. — CRITIQUE DE LA FAMILLE DES *LACTOBACTERIACEAE*

par A.-R. PRÉVOT.

(*Institut Pasteur, Service des anaérobies.*)

I. — INTRODUCTION.

Dans un article récent et en tous points remarquable, L. Berland [1] a pris la défense de la systématique, non pas en tant que but en soi, mais comme moyen indispensable pour se retrouver dans la foule innombrable des formes vivantes, et n'a pas hésité à écrire « que le degré de civilisation des pays se mesure à l'intensité de ces recherches, et qu'il n'est pas exagéré de dire que le niveau de la culture est en rapport avec le nombre de spécialistes en systématique ou en toute autre science ». Mais il conclut que le systématicien ne doit plus se borner à employer les méthodes anciennes, qu'il doit tenter de les perfectionner, en particulier par l'utilisation simultanée des critères anatomiques, physiologiques, éthologiques, géo- et biosociologiques, de façon à faire de cette science une chose vivante, rigoureuse et précise, et non l'art de classer des êtres morts immobilisés dans des collections.

En ce qui concerne les Schizomycètes, j'avais exposé en 1938 [2] des idées parallèles et montré que toute classification

à orientation unilatérale était vouée à l'échec, alors qu'il était possible, sinon facile, d'aboutir à une classification naturelle, logique des bactéries, en utilisant simultanément les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques, ontogéniques, phylogénétiques, écologiques et immunologiques, à condition d'observer une hiérarchie rigoureuse des concepts envisagés, dont le principe fondamental est la priorité du concept morphologique sur les concepts physiologiques. C'est ainsi que j'avais montré que la classification purement physiologique des bactéries avait toujours échoué parce qu'elle aboutit à l'élaboration de groupes morphologiquement hétérogènes, donc artificiels.

Aucun groupement ne peut mieux illustrer cette façon de voir que celui des *Lactobacteriaceae* [3] fondé sur la formation de l'acide lactique comme produit principal de la fermentation des glucides, ce qui, du fait de la fréquence de cet acide et de son absence de spécificité, oblige à réunir de nombreuses espèces morphologiquement très différentes allant des diplocoques les plus simples aux actinomycètes les plus différenciés. Par ailleurs, les connaissances récentes sur le mécanisme de la fermentation de l'acide lactique, rendent cette classification bien précaire. Voici en effet ce que Schoen [4] pouvait conclure en 1931 : « Ce qui caractérise somme toute, la spécificité lactique, si l'on peut employer ce terme, ce n'est ni la faculté des cellules pourvues de cette fonction de produire le méthylglyoxal, ni la faculté de stabiliser celui-ci à l'état d'acide lactique, mais bien leur incapacité de désintégrer ce terme de passage. Cette incapacité est-elle due à l'absence du système catalyseur correspondant, ou est-elle imputable à une paralysie de la cellule ? C'est une question à laquelle on ne saurait répondre dans l'état actuel des choses, mais ce qui semble certain, c'est que la spécificité lactique est déterminée par une déficience cellulaire. »

Or par une singulière infortune, les *Lactobacteriaceae* qui déjà manquent de l'homogénéité morphologique nécessaire à la constitution d'un groupe naturel, ont été agrémentées de nombreuses espèces qui ne sont pas du tout lactiques, ce qui leur ajoute une note fantaisiste assez regrettable.

Voici leur historique brièvement résumé : en 1921 Orla-

Jensen [5] a constitué les *Lactobacteriaceae* en les définissant : Groupe de nombreuses bactéries en sphères ou en bâtonnets, Gram-positives, anaérobies facultatifs ne poussant pas en surface, ayant un besoin important d'aliment azoté ; incapable de libérer O de H₂O².

Subdivision	Sphères.	<i>Streptococcus.</i> <i>Betacoccus.</i> <i>Thermobacterium.</i> <i>Streptobacterium.</i> <i>Betabacterium.</i>
	Bâtonnets.	

Cette proposition a été adoptée par Bergey en 1923, puis modifiée au cours des éditions successives de son Manuel. En 1939, Breed, Murray et Hitchens ont réintroduit les *Streptococceae* dans les *Lactobacteriaceae* et modifié comme suit la définition de ce groupement : « Coccis et bâtonnets isolés ou en paires, ou en chaînes ; fermentant rapidement les hydrates de carbone avec production d'acide lactique et de quelques acides volatils. Quelques types produisent également du CO² et de l'alcool éthylique à partir du glucose, et du mannitol à partir du lévulose. Rarement mobiles. Gélatine rarement liquéfiée. Nitrates non utilisés. Pigment, quand il existe, jaune, rouge orangé ou brun rouille. Aérobies et anaérobies. Ne poussent pas bien à la surface de la gélose. Gram-positifs ».

Cet ensemble hétéroclite est subdivisé en deux tribus :

I. Coccis en paires ou en chaînettes : *Streptococceae* Trevisan 1889 comprenant les genres *Diplococcus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc*.

II. Bâtonnets isolés ou en paires et en chaînes, ou en filaments unicellulaires parfois très longs : *Lactobacilleae* Winslow et alt., comprenant les genres *Lactobacillus* et *Propionibacterium*.

Etudions d'abord les faits expérimentaux qui vont à l'encontre de la conception de Breed, Murray et Hitchens [6] et ne permettent pas de conserver leur classification.

II. — FAITS EXPÉRIMENTAUX PERSONNELS.

1^o STREPTOCOQUES ANAÉROBIES GAZOGÈNES. — Morphologiquement, les Streptocoques anaérobies gazogènes ne se distin-

guent pas des Streptocoques anaérobies non gazogènes, ni des Streptocoques facultatifs. Ces trois groupes sont inséparables et forment la tribu très homogène des *Streptococceae* Trevisan, acceptée universellement. J'ai récemment établi [7] que parmi les produits de la fermentation du glucose par les Streptocoques anaérobies gazogènes suivants : *S. anaerobius*, *S. foetidus*, *S. putridus* et *S. lanceolatus*, on ne trouve pas la moindre trace d'acide lactique. Le premier donne un mélange d'acides formique et acétique ; le second produit un mélange d'acides butyrique, acétique et formique ; le troisième et le quatrième un mélange d'acides valérianique, butyrique et acétique. Seul *S. productus*, nov. spec. [8] produit des traces d'acide lactique en dehors des acides propionique et formique, ceux-ci en quantité importante.

Il y a donc lieu de considérer l'acide lactique non pas comme un produit obligatoire de fermentation des sucres par les Streptocoques, mais comme l'apanage de certaines espèces seulement, et, de ce fait, on doit laisser la tribu des *Streptococceae* rattachée à la famille des *Micrococcaceae* et non à celle des *Lactobacteriaceae*.

2° DIPLOCOQUES ANAÉROBIES. — J'ai établi [9] récemment, avec R. Loth, que *Diplococcus magnus* est un ferment acétique pur du glucose, et ne donne pas de trace d'acide lactique. Cette espèce, morphologiquement, est inséparable des autres Diplocoques. D'autre part, *Diplococcus plagarum belli*, qui est également un ferment acétique du glucose, ne donne que des traces d'acide lactique, et l'on ne peut pas considérer ce dernier comme le produit principal de la fermentation du glucose. Le genre *Diplococcus* ne reconnaît donc pas — non plus que le genre *Streptococcus* — l'acide lactique comme produit principal de fermentation des glucides, et ce fait vient s'ajouter aux précédents pour maintenir la tribu des *Streptococceae* dans la famille des *Micrococcaceae*.

3° GENRE *Propionibacterium*. — J'ai pu étudier récemment le métabolisme d'une souche de *Propionibacterium pentosaceum* Van Niel, que je conserve dans ma collection depuis douze ans. J'ai constaté que cette espèce est capable d'utiliser

l'acide lactique et les lactates, de réduire les nitrates en nitrites [40] et de produire des acides acétique et propionique avec dégagement de CO_2 à partir des glucides (dont les pentoses), mais est absolument incapable de produire de l'acide lactique. Les dix autres espèces connues de ce genre : *freudenreichi*, *shermani*, *rubrum*, *thoeni*, *zeae*, *petersenii*, *jensenii*, *raffinosaceum*, *technicum*, *arabinoseum*, sont également incapables de produire de l'acide lactique.

On comprend difficilement les raisons qui ont incité Breed, Murray et Hitchens à classer dans un groupe de bactéries lactiques des espèces qui s'opposent par tous leurs caractères à la définition posée pour ce groupe. Peut-être est-ce la très grande difficulté de trouver la place exacte du genre *Propionibacterium* qui les a conduits à le situer dans les *Lactobacteriaceae*, en désespoir de cause. C'est un peu le sort qui attend tous les genres créés uniquement sur une base physiologique pure, et sans substratum morphologique solide. Néanmoins, étant donné certaines particularités morphologiques communes à la plupart de ces espèces, telles que formes diptéroïdes, formes coccoïdes, formes longues, irrégulières, ramifiées et en massue, granulations métachromatiques décelables par coloration d'Albert, on pourrait avantageusement les situer au voisinage du genre *Corynebacterium* dans la famille des *Actinomycetaceae*, et probablement même comme un sous-genre physiologique de *Corynebacterium*.

III. — CRITIQUE DU GENRE *Lactobacillus*.

La tribu des *Streptococceae* et le genre *Propionibacterium* ne pouvant pas rester dans les *Lactobacteriaceae*, les espèces constituant la première n'étant pas toutes lactiques, et les espèces constituant la seconde ne l'étant jamais, le groupe proposé par Orla-Jensen et adopté par Breed, Murray et Hitchens se trouve réduit au genre *Lactobacillus* constituant à lui seul la tribu des *Lactobacilleae*.

Sa définition est acceptable puisqu'elle comporte une base morphologique (bâtonnets souvent longs et minces, asporulés, Gram-positifs et immobiles). Par contre, sa compréhension doit être limitée rigoureusement à sa définition, et l'on doit

en exclure les deux espèces *bifidus* et *acidophilus*. J'ai montré en effet [41] qu'il était légitime de ranger la première, avec Orla-Jensen, dans le genre *Bifidibacterium*, en raison de ses formes renflées en massue et de ses extrémités bifides, et de classer ce genre dans la famille des *Actinomycetaceae* entre les genres *Actinobacterium* et *Corynebacterium*. D'autre part, Weiss et Rettger [42], ainsi que de nombreux auteurs, parmi lesquels Eggerth [43], ont établi la parenté étroite des espèces *acidophilus* et *bifidus*, qui sont pour eux des *Actinomycetales*. Il est donc logique de classer l'espèce *acidophilum* tout à côté de l'espèce *bifidum* dans le genre *Bifidibacterium*.

Le genre *Lactobacillus* ainsi épuré ne comprend donc plus que 13 espèces : *caucasicus*, *lactis*, *helveticus*, *bulgaricus*, *thermophilus*, *delbrueckii*, *casei*, *plantarum*, *leichmanni*, *brevis*, *buchneri*, *pastorianus* et *fermenti* qui sont réellement des bactéries répondant à la définition du genre *Lactobacillus*. En définitive, je ne pense pas qu'il soit nécessaire de créer pour lui une famille puisque, tel qu'il est défini et épuré, il entre tout naturellement dans la famille des *Bacteriaceae* Cohn *emend*, au voisinage du genre *Catenabacterium* Prévot. Toutefois il est regrettable qu'il soit formé du mot *bacillus* qui implique l'existence de spores, et si la systématique bactérienne voulait être comme toute science « une langue bien faite », il serait préférable de dire *Lactobacterium* afin de couper court à toute confusion.

CONCLUSIONS.

I. Le genre *Streptococcus* comprend des espèces anaérobies gazogènes qui ne produisent pas d'acide lactique ; ce sont respectivement des ferment acéto-formique, butyro-acéto-formique et valéro-butyro-acétique des glucides. On ne doit donc pas classer ce genre parmi les *Lactobacteriaceae*.

II. Le genre *Diplococcus* comprend une espèce anaérobie qui est un ferment acétique pur des glucides et une autre espèce anaérobie acéto-lactique où l'acide lactique n'est pas le produit principal. Ce genre ne doit donc pas non plus être classé parmi les *Lactobacteriaceae*. La tribu des *Streptococcaceae*, qui comprend les genres *Streptococcus* et *Diplococcus*,

doit donc rester attachée à la famille des *Micrococcaceae* ou Cacci Gram-positifs.

III. Le genre *Propionibacterium* ne comprend que des espèces ne produisant pas d'acide lactique, qui au contraire utilisent les lactates et l'acide lactique. L'espèce *P. pentosaceum*, en plus de ce caractère qui l'éloigne des *Lactobacteriaceae*, réduit les nitrates en nitrites et possède une catalase capable de scinder O de H^2O^2 ; toutes ces propriétés rendent impossible leur classification parmi les *Lactobacteriaceae*. Il s'agit plutôt d'un sous-genre physiologique de *Corynebacterium*.

IV. Le genre *Lactobacillus* ne doit pas comprendre les espèces *bifidus* et *acidophilus*, étroitement parentes, et appartenant en réalité au genre *Bifidibacterium*, famille des *Actinomycetaceae*.

V. Ainsi épuré, le genre *Lactobacillus* comprend 43 espèces très voisines morphologiquement aussi bien que physiologiquement, et trouve sa place naturelle au voisinage du genre *Catenabacterium*, famille des *Bacteriaceae* Cohn emend.

VI. Le groupe artificiel des *Lactobacteriaceae* n'a donc pas sa raison d'être et doit être supprimé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERLAND (L.). *Revue Scient.*, 1940, p. 355.
- [2] PRÉVOT (A.-R.). Vol. Jubil. Maurice Caullery in *Trav. Stat. Zool. de Wimereux*, 43, 1938, p. 597.
- [3] BERGEY'S. *Manual of Determinative Bacteriology*, 5^e édit., 1939.
- [4] SCHOEN. *Ces Annales*, 47, 1931, p. 690.
- [5] ORLA JENSEN. *J. of Bact.*, 6, 1921, p. 263.
- [6] BREED, MURRAY et HITCHENS. *Z. f. Bakt.*, II Abt., 102, 1940, p. 417.
- [7] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 135, 1941, p. 103.
- [8] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 135, 1941, p. 105.
- [9] PRÉVOT (A.-R.) et LOTH (R. S.). *C. R. Soc. Biol.*, séance du 12 avril 1941.
- [10] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 134, 1940, p. 350.
- [11] PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 60, 1938, p. 285.
- [12] WEISS et RETTGER. *J. of Bact.*, 28, 1934, p. 501.
- [13] EGGERTH. *J. of Bact.*, 30, 1935, p. 298.

**SUR UNE MUTATION DE *MORAXELLA LWOFFI*
APTE A SE DÉVELOPPER
DANS LES MILIEUX A L'ACIDE SUCCINIQUE**

par ANDRÉ LWOFF et ALICE AUDUREAU.

(Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur.)

On peut classer en trois catégories les composés organiques susceptibles d'être offerts à *Moraxella lwoffi* pour son alimentation carbonée (A. Lwoff et A. Audureau, 1944) :

- 1° Les substances inutilisables ;
- 2° Les substances permettant un développement plus ou moins rapide et plus ou moins abondant ;
- 3° Les substances qui n'autorisent le développement qu'après un délai négatif plus ou moins important.

En faisant connaître le comportement des divers corps étudiés, nous avons brièvement indiqué que le délai nécessaire pour le départ de la culture en présence des corps de la troisième catégorie était le délai nécessaire pour la production d'une mutation. Ce sont les expériences qui apportent cette démonstration qui sont exposées ici.

Nous rappelons que *Moraxella lwoffi* var. *brevis* peut être entretenue indéfiniment dans un milieu au sulfate d'ammoniaque additionné d'éthanol (A. Audureau, 1940). Si, avec 1 goutte d'une souche de vingt-quatre heures on repique un tube renfermant 5 cent. cubes de milieu, on obtient, après vingt-quatre heures à 37°, une culture abondante. Si l'ensemencement est effectué à partir d'une souche contenant comme aliment carboné 1 goutte d'éthanol à 1 p. 50 pour 5 cent. cubes, on n'observe pas de développement bactérien en l'absence d'aliment carboné. Si le milieu est additionné de succinate de sodium, on n'observe pas non plus de multiplication à 37° pendant une période qui varie de neuf à vingt-cinq jours ; puis, en vingt-quatre heures, il y a apparition

d'une culture abondante. Les bactéries qui se sont ainsi multipliées dans les milieux au succinate se reproduisent rapidement si elles sont réensemencées dans un milieu neuf au succinate.

L'existence d'un délai nécessaire à la souche entretenue en alcool pour se *développer* dans un milieu au succinate a été observée plusieurs centaines de fois. Trois interprétations de ce phénomène pouvaient être envisagées :

a) la souche utilisée était impure, constituée par un mélange de germes dont les uns étaient capables, les autres incapables d'utiliser l'acide succinique ;

b) le délai nécessaire au départ de la culture était dû à la formation d'enzymes adaptatifs ;

c) le délai nécessaire au départ de la culture correspondait au temps requis pour l'apparition d'une mutation.

Pour la commodité de l'exposé qui va suivre, la souche normale entretenue en présence d'éthanol comme aliment carboné sera appelée N. Lorsque, par suite du changement étudié, elle devient capable d'utiliser l'acide succinique, elle sera appelée S +, alors que la souche N est S -, c'est-à-dire incapable d'utiliser immédiatement l'acide succinique. La notation bactérie S + et bactérie S - sera aussi employée suivant que les bactéries sont ou non capables d'utiliser l'acide succinique.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA DURÉE DE LA TRANSFORMATION S- → S +.

On prépare une série de souches à 20, 22, 28, 37 et 39° C en présence de I goutte d'éthanol à 1 p. 50 pour 5 cent. cubes de milieu. Avec II gouttes de ces souches âgées de vingt-quatre heures, on ensemence des tubes de milieu au succinate et on porte les séries de tubes à la même température que celle de la souche avec laquelle ils ont été ensemencés. Les tubes sont examinés tous les jours, et on note le moment où apparaît la culture. Cette culture, ainsi que nous le verrons par la suite, est produite par le développement d'un seul germe. Nous verrons également que l'apparition d'une culture ensemencée avec une seule bactérie demande quarante-huit heures environ. Lorsque nous observons un départ de la

culture dix jours après l'ensemencement, cela veut donc dire qu'il a fallu huit jours pour que l'une des bactéries S- se transforme en une bactérie S+. C'est le temps nécessaire à la production de cette transformation, que par anticipation nous appellerons dès maintenant une mutation, qui est noté sur le tableau I. En regard du chiffre des jours, dans la

TABLEAU I. — Influence de la température sur le temps nécessaire à l'apparition de la mutation.

JOURS	20°	22°	28°	35°	37°	39°
1	0	1	2	0	0	0
2	5	4	2	1	0	0
3	3	1	4	1	1	0
4	4	7	4	2	0	0
5	1	1	2	2	0	0
6	2	1	3	1	0	0
7	1	1	1	2	0	0
8	2	2	1	4	0	0
9	1	1	1	1	1	0
10	2	1	0	1	2	0
11	1	1	0	1	3	1
12	0	0	0	1	4	0
13	0	0	0	1	0	1
14	0	0	0	0	1	2
15	0	0	0	0	2	1
16	0	0	0	1	1	1
17	0	0	0	0	0	2
18	0	0	0	0	0	4
19	0	0	0	0	3	3
20	0	0	0	1	0	0
21	0	0	0	0	0	1
22	0	0	0	0	1	0
23	0	0	0	0	2	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	2
26	0	0	0	0	0	1

La colonne « jours » donne le nombre de jours nécessaires à la production de la mutation. Comme dans un tube ensemencé avec une seule bactérie le développement se produit en quarante-huit heures, le délai nécessaire à la production de la mutation est la durée de l'apparition de la culture diminuée de deux jours. Dans les colonnes correspondant aux diverses températures, les chiffres indiquent le nombre de tubes dans lesquels la mutation s'est produite en un temps donné. Par exemple, en regard du chiffre 2, on trouve dans la colonne correspondant à 20° le chiffre 5 : cela veut dire que dans cinq tubes la mutation s'est produite en deux jours à 20° (culture en quatre jours). Les résultats correspondant à cette expérience sont représentés sur les figures 1 et 2.

colonne correspondant à une température déterminée, on a noté le nombre de tubes dans lesquels la multiplication se produit. Par exemple, en regard du jour 2 on trouvera dans la colonne correspondant à 20° le chiffre 5 : cela veut dire que, dans 5 tubes, la mutation s'est produite en deux jours.

c'est-à-dire que la culture s'est développée le septième jour.

L'examen de la courbe intégrale de fréquence des transformations montre que la fréquence maxima correspond à 2,5 jours à 20, 22, 28°, à 6,5 jours à 33°, à 10,5 jours à 37° et à dix-sept jours à 39°. Entre 20° et 28° il n'y a donc pas d'influence de la température sur la durée de la transforma-

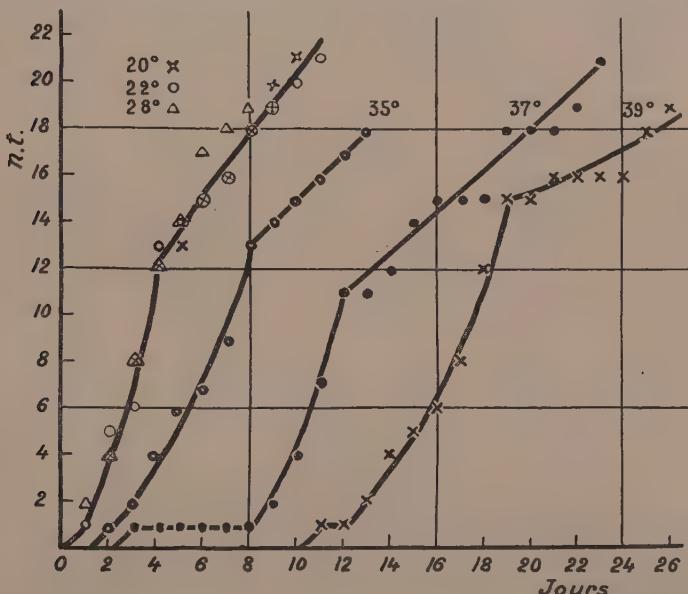


FIG. 1. — Courbe intégrale des durées de mutation. En abscisses, jours; en ordonnées, nombre de tubes. Les points représentent pour chacune des températures le nombre total de tubes dans lesquels la multiplication s'est produite en un temps déterminé. Les valeurs sont calculées d'après les données du tableau I. Par exemple, pour une température de 20°, les points de la courbe correspondent à : 5, 5 + 3 = 8; 8 + 4 = 12, etc. La valeur correspondant au centre de la partie la plus inclinée de la courbe donne le temps moyen de mutation pour chacune des températures (voir fig. 2).

tion $S \rightarrow S+$. Entre 28° et 39° il y a augmentation régulière de cette durée (v. fig. 1).

L'examen du tableau montre que, pour une même température, les temps de transformation sont extrêmement variables suivant les tubes d'une même série. Il peut par exemple y avoir une différence de quinze jours entre 2 tubes. Or tous les tubes ont été ensemencés avec la même quantité de germes appartenant à la même souche. Nous trouvons là un

argument important contre l'hypothèse que la transformation $S \rightarrow S +$ pourrait être due à une adaptation, question qui sera discutée à la fin de ce mémoire.

Dans les expériences que nous venons de relater, les tubes ont été maintenus à la température même d'entretien de la souche. D'autres expériences nous ont montré que le temps nécessaire à la transformation $S \rightarrow S +$ est indépendant de la température à laquelle la souche a été entretenue.

A partir de souches entretenues à 28, 35 ou 39°, nous avons ensemencé une série de tubes à 22, 28, 35 et 39°. Dix séries

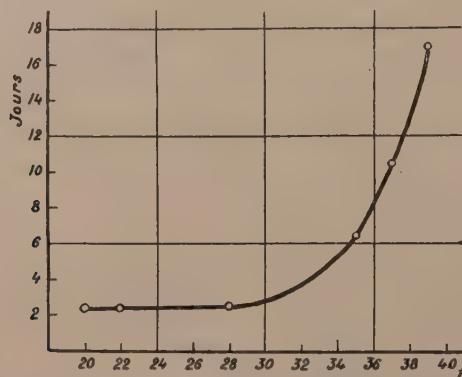


FIG. 2. — Courbe de la durée moyenne de mutation en fonction de la température. En abscisses, température; en ordonnées, temps moyen nécessaire pour l'apparition de la mutation. Pour l'explication, voir légende de la figure 1.

d'expériences ont été ainsi réalisées, dont nous jugeons inutile de donner le détail. Les résultats ont été les suivants.

La durée de la transformation $S \rightarrow S +$ à 22, 28, 35, 39° est la même, que la souche ait été entretenue à 28, 35 ou 39°. La durée de la transformation $S \rightarrow S +$ ne dépend donc pas de la température à laquelle la souche a été cultivée, mais seulement de la température à laquelle l'expérience est réalisée. Ce n'est donc pas l'état antérieur au repiquage qui intervient, mais l'état actuel.

Enfin nous ajouterons que la transformation $S \rightarrow S +$ se produit également à la glacière. Une série de tubes au succinate ont été ensemencés avec la souche N dans les conditions habituelles et portés à la température de +1°. Tous les cinq

jours on reportait l'un des tubes à la température de 35°. C'est à partir du trente-cinquième jour que le développement s'est montré régulier en quarante-huit heures (quarantième et quarante-cinquième jour) et en vingt-quatre heures (cinquantième, cinquante-cinquième et soixantième jour). Le temps nécessaire à la production de la transformation à la température de + 1° est donc de trente-cinq jours environ, temps supérieur à tous ceux observés pour les températures normales.

ISOLEMENTS A PARTIR D'UN SEUL GERME.

A l'aide du micromanipulateur de de Fonbrune, nous avons ensemencé des bactéries isolées à partir d'une souche entretenu en éthanol. Quinze ensemencements ont été réalisés, qui ont donné 7 souches. Les cultures sont apparues à 28° après quarante-huit heures.

Les 7 souches ainsi obtenues à partir d'un seul germe se sont comportées exactement comme la souche originelle. Elles ne se développent à 37° en présence de succinate qu'après un délai de dix jours à trois semaines. Ceci prouve que des germes S- peuvent se transformer en germes S +.

LA PRÉSENCE D'ACIDE SUCCINIQUE EST SANS ACTION SUR LA DURÉE DE LA TRANSFORMATION S- → S +.

Pour la solution du problème qui nous préoccupait, il était essentiel de savoir si l'apparition de la forme S + était favorisée par la présence d'acide succinique.

Des tubes de 5 cent. cubes de milieu sont additionnés de 1 goutte d'éthanol à 1 p. 50 et de 1 goutte de succinate de Na à 1 p. 10. La quantité d'alcool est suffisante pour permettre une bonne culture ; mais il n'y a pas excès d'aliment carboné et un milieu sans aliment carboné ensemencé avec 1 goutte de la souche ne montre pas de culture. Enfin, dans les conditions décrites; c'est la concentration en éthanol qui est le facteur limitant le développement bactérien, pour les bactéries S-, bien entendu. Ceci est très important. En effet, ainsi que nous le verrons par la suite, lorsque l'on met en

TABLEAU II. — Influence de la culture en présence d'acide succinique sur la durée de la transformation $S \rightarrow S+$.

JOURS	39°	37°	35°	22°	20°
2	20	12	3	1	1
3	18	10	14	0	2
4	17	3	15	3	1
5	19	8	6	2	1
6	10	9	5	2	2
7	3	0	0	1	1
8	21	4	3	1	1
9	2	7	10	1	1
10	16	7	9	1	1
11	16	1	1	12	7
12	8	0	0	1	1
13	18	0	0	2	2
14	11	0	0	1	1
15	0	0	0	3	3
16	16			2	2
17	15			4	3
18	0			5	2
19	0			0	6
20	0			1	2
21	0			2	
22	0			0	
23	0			2	

Dans la colonne « jours » les chiffres représentent le nombre de jours de culture dans un milieu à l'éthanol + succinate. Dans les colonnes correspondant aux diverses températures, on a inscrit le nombre de jours nécessaires à l'apparition de la mutation dans le milieu au succinate. Par exemple, dans la colonne 39°, en regard du chiffre 2 on trouve le chiffre 20; cela veut dire qu'après deux jours de culture en milieu à l'éthanol + succinate il a fallu vingt jours pour que la mutation se produise dans le milieu au succinate seul (culture en vingt-deux jours). On voit qu'à partir du dix-huitième jour les tubes souches contenaient des bactéries $S+$, puisque la multiplication dans le milieu au succinate se produisait en quarante-huit heures ou moins (délai 0).

concurrence dans un milieu à base d'éthanol des bactéries $S-$ et des bactéries $S+$, celles-ci disparaissent après quelques passages. Si donc nous voulons être certains de favoriser les formes $S+$ qui pourraient apparaître en présence d'éthanol et de succinate, il faut que le développement de la forme $S-$, lequel ne peut se faire qu'aux dépens de l'éthanol, soit limité. La souche $S+$, qui peut utiliser le succinate, se développera seule lorsque tout l'alcool aura été consommé.

A partir de souches à 20, 22, 35, 37 et 39° C, on ensemence des tubes de milieu avec éthanol et succinate. Ces tubes sont placés à la même température que la souche. Les cultures sont repiquées tous les jours. Tous les jours aussi on ensemence un tube contenant de l'acide succinique comme unique ali-

ment carboné. Les tubes sont examinés tous les jours et on note le moment de l'apparition de la culture. Le temps écoulé entre l'ensemencement et le départ de la culture diminué de deux jours représente, comme dans les expériences précédentes, la durée de la transformation de l'une des bactéries S- en bactérie S+.

Les résultats des expériences sont représentés dans le tableau II. Par exemple, le chiffre 20 en regard du chiffre 2 de la colonne jours, dans la colonne correspondant à 39°, indique qu'après deux jours de culture en présence d'alcool et d'acide succinique, la transformation S- \rightarrow S+ s'est produite en vingt jours dans le milieu à base d'acide succinique (culture en vingt-deux jours).

Ces expériences montrent que la culture préalable de la souche S- en présence d'acide succinique (et d'éthanol) ne diminue pas le temps nécessaire à la transformation S- \rightarrow S+.

D'après les expériences qui précédent, on a l'impression que le succinate ne favorise pas la formation de bactéries S+ ; mais, dans un milieu au succinate, seules les bactéries S+ peuvent se développer et le milieu sélectionne ainsi cette forme S+.

La longue période de latence qui sépare l'ensemencement de bactéries S- du départ de la culture n'est pas due à l'adaptation au succinate, puisque les souches cultivées dans le milieu alcool + succinate se comportent comme les souches en alcool seul.

EXISTENCE DE BACTÉRIES S+ DANS LA SOUCHE N (S-).

Deux séries d'expériences vont montrer que la transformation S- \rightarrow S+ n'est pas une adaptation, mais qu'il existe dans la souche normale S-, isolée à partir d'un seul germe, de très rares bactéries S+.

A. EXPÉRIENCES SUR MILIEUX SOLIDES. — On prépare des milieux synthétiques gélosés à 2 p. 100 (la gélose doit être très soigneusement lavée). Les aliments carbonés, éthanol, succinate de Na sont ajoutés après stérilisation. La gélose est coulée en boîtes de Petri ou en tubes de Legroux. Une souche

en éthanol (ayant passé vingt-quatre heures à 37°) est centrifugée et lavée pour éliminer l'aliment carboné. Elle est ensuite ensemencée à raison de 0 c. c. 1 par boîte, soit pure, soit après des dilutions qui vont jusqu'à 10⁻⁷. Les boîtes sont portées à 37°. Une numération préalable des germes dans les suspensions montre que chaque bactérie donne une colonie sur les milieux à l'alcool ; celles-ci sont bien développées après quarante-huit heures. Sur les milieux sans aliment car-

TABLEAU III. — **Dénombrement des bactéries S + dans une souche N.**

DILUTIONS	NOMBRE DE COLONIES PAR BOÎTE APRÈS 48 HEURES	
	Acide succinique	Ethanol
1	1	> 40.000
10 ⁻¹	0	> 10.000
10 ⁻²	0	> 10.000
10 ⁻³	0	> 10.000
10 ⁻⁴	0	> 10.000
10 ⁻⁵	0	> 6.000
10 ⁻⁶	0	640

Une souche cultivée en milieu à l'éthanol a été centrifugée et lavée. A partir de chaque des dilutions on a ensemencé des milieux gélosés soit à base d'éthanol, soit à base de succinate. Une seule colonie s'est développée sur le milieu au succinate, 640 millions sur le milieu à l'alcool.

boné et sur les milieux au succinate, il n'y a pas eu une seule colonie. Nous avions vérifié préalablement que les bactéries S + se développent fort bien sur un milieu gélosé au succinate. Dans cette expérience, les 3 millions de bactéries qui avaient été ensemencées sur le milieu au succinate étaient donc des bactéries S -. On pouvait conclure, soit qu'il n'y avait pas de bactéries S + dans la souche N, soit qu'elles étaient très rares.

Deux autres expériences ont alors été réalisées, mais on a ensemencé, cette fois, avec une souche préparée de la même façon que dans l'expérience précédente, beaucoup plus de bactéries. Dans chacune des deux expériences, une seule colonie est apparue dans la série des boîtes de milieux au succinate. On avait ensemencé dans la première série 640 mil-

lions de bactéries, dans la seconde 375 millions. Nous avons vérifié que chacune des deux colonies apparues sur le milieu au succinate était constituée par des bactéries S + (repiquages positifs dans les milieux au succinate), et nous avons vérifié également que les cultures ainsi développées étaient bien constituées par *Moraxella lwoffi*.

Ces expériences montrent donc qu'une souche de vingt-quatre heures, dans un milieu à l'éthanol, renferme des bactéries S +, mais que celles-ci sont en proportion infime par rapport aux bactéries S -.

B. EXPÉRIENCES EN MILIEUX LIQUIDES. — Si des bactéries S + existent réellement dans la souche N, il devait être possible de les mettre en évidence par ensemencement large sur milieux liquides.

a) Une souche N ayant passé vingt-trois jours à 28° est centrifugée et lavée. Dix tubes sont ensemencés, chacun avec IV gouttes de suspension, soit avec 8 millions de bactéries. L'un des tubes est additionné d'éthanol, les autres d'acide succinique, et les tubes sont portés à 37°. Dans le tube témoin avec éthanol, il y a une culture abondante après quarante-huit heures (le retard est dû à la centrifugation et au lavage). Après trois jours, il y a une culture dans un seul des 9 tubes au succinate. Dans les autres tubes, il n'y a aucun développement pendant neuf jours ; le dixième jour seulement on note le départ de la culture dans 3 des tubes.

La souche N de vingt-trois jours contenait donc une bactérie S + pour 72 millions de bactéries S -.

b) Une expérience similaire, également à 37°, a été effectuée avec une souche N ayant passé huit jours à 28°. L'ensemencement a été effectué à raison de 12 millions de bactéries par tube. Un seul tube sur 9 a montré une culture le troisième jour ; les autres tubes n'ont pas montré de développement pendant neuf jours ; dans l'un d'eux une culture est apparue au dixième jour.

La souche N de huit jours contenait donc une bactérie S + pour 108 millions de bactéries S -.

c) Une expérience identique a été effectuée avec une souche N ayant passé huit jours à 28°. Vingt-cinq tubes ont été

ensemencés chacun avec 18 millions de bactéries. Aucun des tubes n'a montré de multiplication pendant sept jours. Le huitième jour le développement a commencé dans l'un des tubes.

La souche N de huit jours contenait donc moins d'une bactérie S + pour 450 millions de bactéries S -.

d) Une expérience similaire a été réalisée avec une souche N de quarante-huit heures. Aucun des 11 tubes, dont chacun a reçu 11 millions de bactéries, n'a montré de développement pendant onze jours. Le douzième jour, le développement a commencé dans 3 des tubes.

La souche N de deux jours renfermait donc moins d'une bactérie S + pour 121 millions de bactéries S -.

L'ensemble de ces expériences réalisées sur milieux solides et en milieux liquides montre que des bactéries S + existent en proportion infime parmi les bactéries S - de la souche N.

STABILITÉ DE LA SOUCHE S +.

Nous avons noté que lorsqu'on ensemence simultanément dans un milieu à l'éthanol des bactéries S - et S +, celles-ci disparaissaient. Cette disparition est due à la concurrence des bactéries S -, et non à la transformation spontanée S + \rightarrow S -. Les expériences suivantes montrent en effet que les bactéries S + présentent un certain degré de stabilité.

Une souche S + est entretenue à 39° par repiquages journaliers pendant un mois dans le milieu au succinate. Elle est alors transportée dans le milieu à l'alcool où elle subit, toujours à 39°, 60 passages en soixante jours. A ce moment, on effectue une numération des bactéries S + et S - de la culture, et l'on constate que toutes sont des bactéries S +.

Comme la transformation S - \rightarrow S + se produit plus rapidement à 28° qu'à 39°, on aurait pu supposer aussi que la transformation inverse serait plus facile à 28° qu'à 39°. La souche S + ayant passé deux mois à 39° est transportée à 28°. Après deux repiquages, on laisse la souche vieillir pendant huit jours. On constate alors que, dans cette souche de huit jours, toutes les bactéries sont S +. A partir de cette souche vieillie pendant huit jours, on effectue 7 passages à vingt-

quatre heures d'intervalle, toujours à 28°. Après ces 7 passages, toutes les bactéries sont toujours S +.

Ces expériences montrent que la forme S + possède une certaine stabilité. Nous ne voudrions pas cependant conclure que la transformation S → S + soit irréversible, en d'autres termes, que la transformation S + → S - ne puisse avoir lieu. Le changement S → S + est, nous l'avons vu, excessivement rare et l'on ne peut conclure d'expériences négatives, en nombre restreint, conduites pendant une durée forcément limitée, à l'impossibilité d'un phénomène dont l'existence n'a pas été constatée.

CONCURRENCE DES BACTÉRIES S + ET S -.

Puisque des formes S + apparaissent spontanément dans les cultures en milieu à base d'éthanol, on pouvait se demander pourquoi les souches N sont toujours S -.

Ensemencons simultanément dans un milieu à l'éthanol une souche S + et une souche S -. Repiquons tous les jours la culture mixte. Après trois semaines, la culture est constituée entièrement par des bactéries S -. Deux expériences similaires ont donné le même résultat.

Dans une troisième expérience nous avons ensemencé le milieu à l'éthanol avec 0 c. c. 9 d'une souche S + et 0 c. c. 1 d'une souche S - (souches de vingt-quatre heures). Les cultures placées à l'étuve à 28° ont été repiquées tous les jours. Après 3 repiquages, c'est-à-dire quatre jours après le premier ensemencement, la culture a été centrifugée, le culot repris dans un milieu sans aliment carboné, la suspension a été diluée, et 1 goutte de chacune des dilutions a été ensemencée d'une part dans le milieu à l'éthanol, d'autre part dans le milieu au succinate (v. tableau IV, p. 106). Dans le milieu à l'éthanol, le développement s'est produit jusqu'à dans le tube ensemencé avec la dilution 10⁻⁶; dans le milieu au succinate, dans le tube ensemencé avec la dilution 10⁻⁵ seulement. Après 8 repiquages, c'est-à-dire neuf jours après l'ensemencement mixte, la même opération a été répétée. Le développement s'est produit dans les tubes avec éthanol

TABLEAU IV. — Elimination des bactéries S + en concurrence avec les bactéries S —.

DILUTIONS	APRÈS 4 JOURS (3 repiquages)		APRÈS 9 JOURS (8 repiquages)	
	Ethanol	Succinate	Ethanol	Succinate
10 ⁻¹	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	0	+	0
10 ⁻⁷	0	0	+	0

Dans un milieu à l'éthanol on a ensemencé simultanément 0 c.c. 9 de bactéries S + et 0 c.c. 1 de bactéries S —. Après un nombre variable de repiquages la culture a été centrifugée et les bactéries ensemencées, après dilution, dans des milieux à l'éthanol et dans des milieux au succinate. +, culture; 0, pas de culture. Dans la deuxième expérience, après huit repiquages l'ensemencement correspondant à la dilution 10⁻⁶ renfermait 40 bactéries. Le rapport des bactéries S +/S — était donc passé en neuf jours de 9 à moins de 0,025.

jusqu'à la dilution 10⁻⁷, dans les tubes avec succinate jusqu'à la dilution 10⁻⁵ seulement.

Ces expériences montrent que les bactéries S + ont tendance à disparaître et disparaissent effectivement lorsqu'elles sont mises en concurrence avec des bactéries S — dans un milieu à l'éthanol. L'élimination des bactéries S + se produit même lorsqu'on ensemence neuf fois plus de celles-ci que de bactéries S —.

Les choses ne se passeraient pas autrement si les bactéries S + se multipliaient plus lentement que les bactéries S —.

Nous rappelons ici, pour les confirmer, les faits notés dans notre précédent travail : la souche N est incapable d'utiliser immédiatement comme aliment carboné, non seulement l'acide succinique, mais aussi les acides fumarique et (l)-malique. Les bactéries N sont donc S —, F — et M —. Au contraire, les bactéries S + sont susceptibles d'utiliser immédiatement les acides fumarique et (l)-malique. Les bactéries S + sont donc F + et M +.

L'étude physiologique comparative de la souche normale et des diverses mutations fera l'objet d'un mémoire séparé.

LA TRANSFORMATION $S \rightarrow S+$ EST UNE MUTATION.

On a rapporté à des mutations de nombreux changements des propriétés observées chez les bactéries. Rares sont cependant les cas où la réalité d'une mutation a été démontrée. Enfin le nombre est restreint des mutations certaines que l'on peut rapporter à un changement biochimique défini. Les seuls faits de cet ordre semblent relatifs à l'acquisition par certains représentants de la série coli-typhique-dysentérique du pouvoir de faire fermenter des glucides non attaqués par les souches normales. Le cas le mieux étudié est celui du comportement de *E. coli* vis-à-vis des glucides, et surtout vis-à-vis du lactose.

Massini (1906) [in Neisser (1906)] (1) a décrit une souche de *E. coli* n'acidifiant pas les milieux en présence de lactose et ayant acquis soudainement ce pouvoir. Massini (1907) conclut que ce changement était une mutation. J. G. Marchal (1932) montre que dans une souche normale isolée à partir d'une seule bactérie on voit apparaître des formes faisant fermenter le lactose. Enfin I. M. Lewis (1934) dénombre dans une souche les bactéries attaquant ou n'attaquant pas le lactose et trouve qu'un germe seulement sur 400.000 est capable de faire fermenter le lactose et de l'utiliser comme unique aliment carboné. Des expériences de Lewis ressort clairement le fait que des germes attaquant le lactose existent dans des milieux dépourvus de lactose. « Nous sommes obligés de conclure — écrit Lewis — que les sucres ou alcools agissent comme agents sélectifs spécifiques, plutôt que comme stimulants de la variation. »

Cependant Karström nie la possibilité de l'apparition spontanée d'enzymes se faisant indépendamment de l'action du substrat. D'après cet auteur, le phénomène envisagé dans le cas de *E. coli* se déroulerait de la façon suivante : par suite

(1) La découverte du phénomène et son interprétation sont souvent attribuées à Neisser, mais en réalité Neisser a simplement présenté les résultats obtenus par son élève Massini à une réunion de microbiologistes à Berlin. Le texte de Neisser ne laisse place à aucune ambiguïté ; encore convient-il de s'y reporter.

d'une mutation ou d'une variation, la bactérie acquiert le pouvoir de former la lactase et peut ainsi, en présence de lactose, former effectivement la lactase. La lactase de *E. coli* serait un enzyme adaptatif.

Une digression est ici nécessaire. On sait depuis longtemps que « la production de diastases est en rapport avec le mode d'alimentation » (Duclaux, 1899). C'est ainsi que l'*Aspergillus glaucus* ne sécrète pas de caséase ni de présure s'il est cultivé sur un milieu à base d'acide lactique ou de sucre (saccharose), mais en sécrète par contre en présence de lait. Sur le milieu au lactate, il y a sécrétion d'amylase, non de sucrase, alors que sur le milieu au sucre, il y a sécrétion de sucrase et non d'amylase (Duclaux, 1899). On sait maintenant que nombreux sont les micro-organismes qui n'attaquent un substrat déterminé qu'après un contact plus ou moins prolongé avec ce substrat. Karström, à qui l'on doit une étude détaillée et systématique de ce phénomène, a groupé sous deux chefs les enzymes bactériens : 1^o les enzymes constitutifs, qui sont toujours présents dans les micro-organismes et dont la formation est « en principe » indépendante de la présence du substrat spécifique ; 2^o les enzymes adaptatifs, dont la formation dépend de la présence du substrat. Ces enzymes, on le sait, peuvent se former en l'absence de toute multiplication microbienne. C'est le cas de l'hydrogénelyase de *E. coli* (Stephenson et Stickland, 1933) et de la galactozymase de *Saccharomyces cerevisiae* (Stephenson et Yudkin, 1936). D'après Karström, les enzymes formés par « adaptation lente » chez une bactérie sont des « enzymes adaptatifs dont la formation doit être rapportée à la variabilité des micro-organismes et à la sélection naturelle des variants aptes à se reproduire en présence du substrat spécifique ».

Ce qui est certain, en tout cas, c'est que le temps nécessaire pour la production du phénomène appelé « adaptation lente » représente, dans quelques cas au moins, le temps nécessaire à l'apparition et à la sélection de la mutation, et non à l'adaptation lente des enzymes.

Il faut noter aussi que, par définition, les enzymes adaptatifs disparaissent en l'absence du substrat spécifique. Cela a été effectivement constaté par exemple pour l'hydrogène-

lyase de *E. coli* par M. Stephenson et Stickland (1932) et pour la galactozymase de *Saccharomyces cerevisiae* par M. Stephenson et Yudkin (1936). Or la souche de *E. coli* ayant acquis le pouvoir d'utiliser le lactose conserve ce pouvoir en l'absence du glucide considéré. Ce fait semble aller à l'encontre de la conception d'après laquelle l'enzyme attaquant le lactose est un enzyme adaptatif.

Chez *Moraxella lwoffi* le changement $S \rightarrow S +$ a été obtenu chez 2 souches normales, T et B, isolées à partir de 2 malades différents, et chez 7 clones, isolés à partir d'une seule bactéries. Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement de la souche $S -$ et le départ de cette souche en présence d'acide succinique est, nous l'avons vu, variable suivant la température et variable aussi pour une même température. Si la transformation était une adaptation, on pourrait s'attendre, étant donné le grand nombre de bactéries $S -$ ensemencées (plusieurs millions par tube) à une plus grande régularité du phénomène.

La présence d'acide succinique est sans influence sur la durée de la transformation $S \rightarrow S +$. Il existe des bactéries $S +$ dans la souche normale ; ces bactéries sont parfois en très petit nombre : une pour plusieurs centaines de millions. Enfin la souche $S +$ entretenue pendant deux mois en l'absence de succinate reste apte à utiliser l'acide succinique.

De tout ce qui précède, il semble logique de conclure que la variation $S \rightarrow S +$ est une mutation. L'acide succinique dans un milieu contenant le succinate de sodium comme unique aliment carboné joue donc un rôle sélecteur : il permet d'obtenir le développement de la forme $S +$ à l'exclusion de la forme $S -$.

La possibilité pour *Moraxella lwoffi* de former une mutation $S +$ s'est montrée constante pendant deux ans. La souche utilisée a été déposée en 1939 à la collection de l'Institut Pasteur (R. Legroux) et à la collection du Lister Institute (R. St-John Brooks). Avec la souche de la collection de l'Institut Pasteur, entretenue sur gélose bouillon ordinaire depuis dix-huit mois, nous avons retrouvé, en 1940 et 1941, la même mutation, se produisant dans les mêmes conditions qu'en 1939. Cette mutation a été obtenue jusqu'ici plus de 350 fois.

On peut donc conclure que la possibilité de la transformation $S \rightarrow S +$ est une propriété stable de *Moraxella lwoffi*. La possibilité de l'apparition de tel ou tel enzyme, qu'il se forme par adaptation ou par mutation, est manifestement une propriété de l'espèce ou de la variété. Si nous voulons faire intervenir les enzymes dans la diagnose des espèces, il faudra nécessairement considérer trois sortes d'enzymes :

- 1° Les enzymes constitutifs au sens de Karström ;
- 2° Les enzymes adaptatifs possibles au sens de Karström ;
- 3° Les enzymes liés à l'apparition d'une mutation.

La définition d'une espèce doit comprendre nécessairement, non seulement les propriétés actuelles, mais, pour employer l'expression de Pasteur, le « devenir » de cette espèce.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° *Moraxella lwoffi* cultivée en milieu synthétique à base de sulfate d'ammoniaque et d'éthanol est incapable de se multiplier d'emblée dans un milieu où l'aliment carboné est représenté par l'acide succinique (bactéries $S -$). Le développement en présence de succinate ne commence qu'après une phase négative de durée variable suivant la température. Pour une même température, il y a également des différences qui peuvent atteindre quinze jours entre les différents tubes.

2° Sept clones isolés à partir d'une seule bactérie se sont comportés de la même façon que les deux souches normales isolées à partir de deux malades.

3° Les bactéries cultivées en milieu à l'éthanol + acide succinique se comportent exactement de la même façon que les bactéries cultivées en présence d'éthanol seul.

4° Dans une souche normale, isolée ou non à partir d'un seul germe, entretenue en présence d'éthanol, il existe des bactéries susceptibles de se multiplier en présence d'acide succinique (bactéries $S +$). La proportion des bactéries $S +$ par rapport aux bactéries $S -$ est de une pour plusieurs dizaines ou pour plusieurs centaines de millions.

5° Les bactéries $S +$ disparaissent lorsqu'elles sont mises en concurrence avec des bactéries $S -$ dans un milieu à base d'éthanol.

6° Les bactéries S + entretenues dans un milieu à base d'éthanol conservent pendant plus de trois mois la propriété d'utiliser immédiatement l'acide succinique. La transformation S + \rightarrow S - n'a pas été obtenue au cours de nombreuses expériences.

7° La transformation S - \rightarrow S + est une mutation dont l'apparition a été observée plus de trois cent cinquante fois en deux ans.

8° L'acide succinique est sans influence sur la genèse de la mutation. Les milieux à l'acide succinique exercent une action sélective : ils permettent le développement des bactéries S + à l'exclusion des bactéries S -.

BIBLIOGRAPHIE

AUDUREAU (A.). Ces *Annales*, **64**, 1940, p. 126.
DUCLAUX (E.). *Traité de Microbiologie*, **2**, Paris, Masson, 1899.
HADLEY (Ph.). *Jl. infect. Dis.*, **60**, 1937, p. 129.
KARSTRÖM (H.). *Ergeb. Enzymforsch.*, **7**, 1938, p. 350.
LEWIS (I. M.). *Jl. Bact.*, **28**, 1934, p. 619.
LWOFF (A.) et AUDUREAU (A.). Ces *Annales*, **66**, 1941, p. 417.
MARCHAL (J. G.). *Variation et Mutation en Bactériologie*, Paris, Le François, 1932.
MASSINI. *Arch. f. Hyg.*, **61**, 1907, p. 250.
NEISER. *Zentralbl. Bakt.*, I Ref., **38**, 1906, sup., p. 98.
STEPHENSON (M.) et STICKLAND (L. H.). *Bioch. Jl.*, **26**, 1932, p. 712.
STEPHENSON (M.) et STICKLAND (L. H.). *Bioch. Jl.*, **27**, 1933, p. 1528.
STEPHENSON (M.) et YUDKIN (J.). *Bioch. Jl.*, **30**, 1936, p. 506.

DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE
DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS A,
ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE
ET ANTI-ŒDEMATIENS

PRÉPARATION, TITRAGE ET PROPRIÉTÉS
DES TOXINES CORRESPONDANTES

(TROISIÈME MÉMOIRE)

TOXINE ET ANTITOXINE DU VIBRION SEPTIQUE *

par MAYLIS GUILLAUMIE.

SOMMAIRE

- I. Procédé de préparation de la toxine vibrion septique.
 - A. Bouillon ensemencé.
 - B. Souche employée.
 - C. Poids de la toxine précipitée par le sulfate d'ammonium.

II. Titrage de la toxine vibrion septique.

- A. VALEUR DE LA DOSE MINIMA MORTELLE.
 - 1^o *Dose minima mortelle et stabilité de la toxine vibrion septique préparée dans le bouillon Vf ordinaire (digestion pepsique de viande et de foie de bœuf).*
 - a) Dose minima mortelle de la toxine liquide.
 - b) Dose minima mortelle de la toxine précipitée.
 - c) Propriétés antigènes de la toxine précipitée.
 - d) Stabilité de la toxine vibrion septique, liquide et précipitée.
 - 2^o *Dose minima mortelle de la toxine vibrion septique obtenue dans le bouillon Vf ordinaire additionné de différentes substances.*

* Synonymes : *Œdembacillus* ; *Bacillus septicus* ; *Clostridium septicum* ; *Clostridium œdematis-maligni*.

a) Toxinogénèse en présence de phosphate bipotassique et de pyruvate de sodium.

a) Action du tampon sur la toxinogénèse.

b) Vitesse de formation dans la toxine vibrion septique.

b) Toxinogénèse en présence d'acide ascorbique (vitamine C).

c) Toxinogénèse en présence de sang desséché.

3^o *Dose minima mortelle de la toxine vibrion septique préparée dans divers bouillons.*

a) Digestion pepsique de foie de cheval.

b) Digestion pépsique de viande et de foie de cheval.

B. VALEUR DE LA « DOSE-TEST » DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE.

III. Titrage des sérum anti-vibrion septique.

COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC DIVERS ÉCHANTILLONS DE TOXINE HOMOLOGUE.

a) Titrages avec une « unité » de toxine.

b) Titrages avec une « dose-test » de toxine.

IV. Résumé et conclusions.

Après avoir présenté, dans un mémoire antérieur (1), l'historique de la question du titrage des sérum anti-*perfringens*, anti-vibrion septique, anti-histolytique et anti-*œdematiens*, nous avons insisté sur la fréquence des résultats discordants que l'on obtient au cours de la détermination du titre antitoxique des sérum anti-*perfringens* effectuée *in vivo* avec divers échantillons de toxine homologue ; nous avons multiplié les exemples afin de bien mettre en évidence l'imprécision des données fournies par cette méthode de dosage et la variabilité de constitution antigénique de la toxine *perfringens*. Nous avons montré qu'il existe des différences de composition non seulement entre des échantillons de toxine préparés de la même manière dans des bouillons Vf (2) faits à des dates différentes, mais encore entre des toxines élaborées dans des volumes égaux du même bouillon. Nous avons indiqué le mode général de préparation de ces échantillons, évalué les effets hémolytiques et gélatinolytiques de quelques-uns

(1) GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, 66, 1941, p. 205 à 247.

(2) Digestions pepsiques de viande et de foie de bœuf.

d'entre eux et finalement comparé les valeurs antitoxiques et antihémolytiques (3) de plusieurs sérum anti-*perfringens*.

Nous exposons dans le travail actuel les résultats de nos recherches, d'une part, sur la préparation et le titrage de la toxine du vibron septique, d'autre part, sur l'évaluation *in vivo* de l'activité antitoxique des sérum anti-vibron septique.

* * *

Depuis les premières observations de Leclainche (4), de Leclainche et Morel (5) sur les propriétés toxiques des cultures de Vibron septique, de nombreux auteurs ont déterminé, par des procédés variés (injections intraveineuses au cobaye, au lapin ou à la souris, injections intramusculaires ou intrapéritonéales au cobaye) et après des périodes d'incubation plus ou moins longues, la toxicité des bouillons qu'ils ont ensemencés. (Les durées d'incubation des cultures ont été de dix-huit à quarante-huit heures ou de cinq à quinze jours.) A peu près tous les auteurs ont employé des bouillons glucosés (6) et, des recherches comparatives effectuées par Karube, par Walbum et Reymann, il ressort que les concentrations élevées en glucose permettent d'obtenir des toxines contenant, par centimètre cube, un nombre plus grand de doses mortelles que les bouillons plus faiblement glucosés.

Dans le but de renforcer la production de la toxine, quelques auteurs ont ajouté de la craie au bouillon pour neutraliser l'acidité qui augmente progressivement pendant le développement (7) ou des peptones variées pour accroître la valeur

(3) GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, **66**, 1941, p. 329.

(4) LECLAINCHE. *Arch. Méd.*, Toulouse, 1898, p. 397.

(5) LECLAINCHE (E.) et MOREL. Ces *Annales*, **16**, 1901, p. 1.

(6) NICOLE (M.), CÉSARI (E.) et RAPHAËL (A.). Ces *Annales*, **29**, 1915, p. 165. — RAPHAËL (A.) et FRASEY. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **61**, 1915, p. 361. — WEINBERG (M.) et SEGUIN (P.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **80**, 1917, p. 715. — WUTH (O.). *Bioch. Zeitsch.*, **13**, 1919, p. 1181. — BENGSTON (Ida). *Public Health*, **49**, 1934, p. 251. — ROBERTSON (Muriel). *J. of Path. a. Bact.*, **23**, 1919, p. 153 à 170. — KARUBE (H.). *Jap. Journ. of exper. Med.*, **42**, 1934, p. 151 à 168.

(7) FICKER (M.). *Med. Klin.*, **13**, 1917, p. 1181. — WUTH (O.). *Loc. cit.* — WALBUM (L. E.) et REYMANN (G. C.). *J. of Path. a. Bact.*, **42**, 1936, p. 351 à 361.

nutritive des bouillons : les résultats les meilleurs sont obtenus avec la peptone Chapoteaut dans les expériences de Karube (8), avec la peptone Riedel dans les expériences de Walbum et Reymann. L'addition de *sérum de cheval*, considérée comme favorable par Ida Bengston, est jugée inutile par Walbum et Reymann. M. Roberston a ajouté du *foie frais de* cobaye, Barg (9), de la *substance cérébrale* ; quelques auteurs ont comparé plusieurs sortes de bouillons de viande : d'après Karube, le bouillon à la viande de veau et le bouillon Vf sont supérieurs au bouillon ordinaire, au bouillon Martin ou au bouillon Tarozzi.

Nous n'indiquerons pas les titres très faibles des toxines obtenues par les premiers expérimentateurs : les résultats des titrages effectués après de longues périodes d'incubation (neuf à quinze jours) n'indiquent vraisemblablement pas la toxicité maxima atteinte par les cultures. Le premier, Ficker, a donné le titre de toxines de grande nocivité : 200 D. M. M. par centimètre cube, après huit jours de culture en bouillon glucosé additionné de craie et d'huile de paraffine (titrages sur souris de 15 grammes, injections intraveineuses).

Au cours de nos différentes expériences nous avons évalué, seize à quarante-deux heures après l'ensemencement et par la méthode des injections intraveineuses à des souris de 17 à 20 grammes, le titre de la toxine vibrion septique obtenue dans du bouillon Vf glucosé à des taux variés, additionné ou non de substances susceptibles de renforcer la toxinogenèse.

(8) D'après cet auteur il se produit de l'hémolysine dans les milieux contenant de la peptone Chapoteaut et il ne s'en produit pas dans les milieux avec peptone de Witte.

(9) BARG (C. S.). *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 74, 1932, p. 367.

I. — PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE

A. — Bouillon ensemencé dans nos expériences.

Du bouillon Vf ordinaire — préparé avec de la viande et du foie de bœuf — est porté à la température de 60°-70°, puis additionné d'une quantité suffisante de soude pour ajuster le pH à 7,7-7,8 ; après un chauffage de quinze minutes à 100° suivi d'une filtration, il est réparti en flacons de 5 litres en verre pyrex ; il est ensuite glucosé à raison de 2, 5 ou 10 grammes par litre et, finalement, stérilisé à 110° pendant vingt-cinq à trente minutes (10). Le bouillon stérile est rapidement amené à la température de 37° dans un bain-marie et chaque flacon est alors ensemencé avec 30 cent. cubes environ d'une culture de seize à vingt heures de vibrion septique faite dans du bouillon Vf, pH 7,6-7,7, glucosé à 2 ou 5 p. 1.000 (11). Au bout de vingt-quatre, trente-six ou quarante-deux heures d'étauve à 37°, les cultures sont centrifugées ; une partie du liquide de centrifugation est conservée au frigidaire, l'autre partie est additionnée de 625 ou de 700 grammes par litre de sulfate neutre d'ammonium chimiquement pur, pour précipiter la toxine vibrion septique. Nous effectuons cette précipitation exactement comme nous l'avons fait pour obtenir la toxine *perfringens* précipitée (12).

B. — Souche employée.

Jusqu'en janvier 1939, nous avons utilisé, pour préparer régulièrement les quantités de toxine vibrion septique nécessaires à l'immunisation de nos chevaux et au titrage des sérum, une souche de vibrion septique (souche Feunten) subissant tous les mois, depuis des années, deux passages sur cobayes.

Le pouvoir toxigène de cette souche s'étant progressivement

(10) En déterminant, après stérilisation, le pH de 16 bouillons glucosés à 5 p. 1.000, nous avons constaté que le pH de 4 d'entre eux était de 7,5 ou 7,55, et celui des 12 autres de 7,6 ou 7,65.

(11) Lorsque l'ensemencement ne peut être effectué le jour même de l'alcalinisation et de la stérilisation du bouillon, nous conservons les flacons à la température du laboratoire. Le jour de l'ensemencement le bouillon est d'abord privé d'air par un chauffage de trente-minutes à 100°, il est ensuite rapidement amené à 37°, puis les différents flacons sont ensemencés comme ci-dessus.

(12) GUILLAUMIE (Maylis). Ces Annales, 66, 1941, p. 228.

affaibli pendant le dernier trimestre de l'année 1938, nous l'avons abandonnée et, depuis le début de 1939, nous employons un échantillon de cette souche conservé à la température du laboratoire depuis 1917, dans un tube scellé sous le vide. Après un seul repiquage et sans passage préalable sur animal, elle nous permet d'obtenir d'emblée, ainsi que nous le verrons plus loin, des échantillons de toxine liquide et de toxine précipitée de titre élevé.

C. — Poids de la toxine précipitée.

La toxine qui vient d'être précipitée par le sulfate d'ammonium est aussitôt placée dans de grandes boîtes de Pétri inclinées ou essorée par succion prolongée sur la plaque poreuse d'un filtre en verre d'Iéna ajusté sur une fiole à tubulure latérale reliée à une trompe à vide. La toxine ainsi débarrassée le plus possible du sulfate d'ammonium dont elle est imprégnée est ensuite desséchée dans une cloche à vide, à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Après pulvérisation, nous la conservons à 2° en ampoules de verre scellées sous le vide.

Dans le tableau I nous spécifions la date de préparation de 14 échantillons de toxine sèche, la concentration du bouillon en glucose, le poids de toxine obtenu par litre de bouillon et la dose minima mortelle de chaque échantillon.

Les résultats de ce tableau indiquent que nous avons obtenu 6 gr. 400 à 18 gr. 250 de toxine sèche par litre de bouillon ensemencé ; la moyenne de 14 préparations est de 9 gr. 520 par litre.

Nous avons calculé le poids moyen de toxine obtenue à partir des bouillons contenant 2, 5 ou 10 grammes par litre de glucose.

Voici nos résultats :

	GRAMMES par litre
Poids moyen de toxine obtenu dans les bouillons glucosés à 2 p. 1.000	6,950
Poids moyen de toxine obtenu dans les bouillons glucosés à 5 p. 1.000	11,980
Poids moyen de toxine obtenu dans les bouillons glucosés à 10 p. 1.000	9,630

TABLEAU I. — **Dose minima mortelle de 14 échantillons de toxine vibrion septique préparés dans des bouillons Vf glucosés à 2, 5 ou 10 grammes par litre. Poids sec de toxine obtenu par litre de bouillon ensemencé.**

ÉCHANTILLON DE TOXINE (date de l'ensemencement)	GLUCOSE par litre de bouillon (grammes)	POIDS SEC de toxine par litre de bouillon (grammes)	DOSE minima mortelle (milligramme)
V ₁ (7 février 1935) . . .	2		0,09
V ₂ (28 février 1935) . . .	2		0,08
V ₃ (24 février 1937) . . .	2	7,200	0,07
V ₄ (6 novembre 1937) . . .	2	7,250	0,08
V ₅ (18 avril 1938) . . .	2	6,400	0,045
V ₆ (25 février 1939) . . .	5	7,650	0,07
V ₇ (4 mars 1939) . . .	5	10,300	0,08
(1 ^{er} avril 1939) . . .	5		0,07
V ₈ (30 août 1939) . . .	5	10,200	0,08
V ₉ (25 octobre 1939) . . .	5	18,250	0,05
V ₁₀ (25 octobre 1939) . . .	5	13,500	0,05
V ₁₁ (6 novembre 1937) . . .	10	12,500	0,08
V ₁₂ (18 avril 1938) . . .	10	6,400	0,05
(27 juin 1936) . . .	10	10	0,08

Ces chiffres moyens indiquent que le bouillon glucosé à 10 p. 1.000, moins favorable à la production de la toxine vibrion septique que le bouillon glucosé à 5 p. 1.000, est préférable au bouillon glucosé à 2 p. 1.000. Faisons remarquer toutefois que le poids de toxine et le nombre de doses mortelles obtenus dans les bouillons glucosés à 10 p. 1.000 ne sont pas d'une manière constante supérieurs à ceux que l'on recueille à partir des bouillons glucosés à 2 p. 1.000. Ainsi le 6 novembre 1937, après quarante-deux heures d'étuve, nous avons bien obtenu, par litre de bouillon, un poids de toxine plus grand dans le bouillon glucosé à 10 p. 1.000 (12 gr. 500) que dans le même bouillon additionné seulement de 2 p. 1.000 de glucose (7 gr. 250) ; mais dans l'essai du 18 avril 1938, par contre, cette action favorisante d'une très forte concentration de glucose sur la production de la toxine ne s'est pas manifestée : nous avons obtenu au bout de quarante-deux heures d'étuve, par litre de bouillon, 6 gr. 400 de toxine sèche d'activité analogue, que le bouillon soit glucosé à 2 ou à 10 p. 1.000.

Nous avons calculé le pourcentage de toxine précipitée par

le sulfate d'ammonium. Au cours des 10 expériences examinées à ce point de vue nous avons constaté que le précipité obtenu contenait respectivement 51,4, 45, 50, 71, 85,7, 56,4, 50,3, 91, 90, 58 p. 100 de la toxine présente dans le liquide soumis à la précipitation. Le pourcentage moyen de la toxine précipitée au cours de ces 10 expériences a été de 64,8 p. 100 (le plus faible se rapporte à la toxine V_4 et le plus élevé à la toxine V_9).

II. — TITRAGE DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE

A. — Valeur de la dose minima mortelle.

1° DOSE MINIMA MORTELLE ET STABILITÉ DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE PRÉPARÉE DANS LE BOUILLON VF ORDINAIRE.

a) DOSE MINIMA MORTELLE DE LA TOXINE LIQUIDE. — Le titre des toxines est déterminé, aussitôt après la centrifugation, sur souris de 17 à 20 grammes (13). Au cours de ces titrages chaque souris reçoit, en injection intraveineuse, 0 c. c. 5 des liquides centrifugés, convenablement dilués; dans le tableau II, nous indiquons les dilutions que nous effectuons généralement.

Résultats : 1° Lorsque nous avons effectué l'ensemencement des bouillons avec la souche de vibrion septique qui venait de

(13) Nous avons déterminé aussi le titre de plusieurs échantillons de toxine vibrion septique filtrés sur bougie L_3 . Mais avant d'effectuer cette filtration nous avons pris la précaution de clarifier la toxine en l'additionnant de 2 p. 1.000 de célite (de célite n° 503 ou d'hyflosupercel). Le mélange est agité, filtré plusieurs fois sur papier, puis sur bougie. Dans ces conditions, toute la toxine traverse la bougie : on s'en assure en déterminant comparativement le titre de la toxine simplement centrifugée et de la toxine filtrée après clarification.

La célite est aussi un bon adjuvant de filtration dans le cas de la toxine *perfringens* ; en utilisant comparativement la terre d'infusoires et la célite pour clarifier cette toxine avant de la filtrer sur bougie, nous avons constaté qu'il vaut mieux employer la première substance que la deuxième : le titre de la toxine *perfringens* filtrée après agitation avec la terre d'infusoires est beaucoup plus faible que celui de la toxine clarifiée avec la célite.

TABLEAU II. — Détermination du titre d'un échantillon de toxine vibron septique.

NUMÉRO des mélanges	TOXINE centrifugée (centimètres cubes)	EAU physiologique (centimètres cubes)	VOLUME TOTAL (centimètres cubes)	QUANTITÉ de toxine dans 0 c. c. 5 des mélanges (centimètre cube)
1	1	4	5	1/10
2	2 à 1 p. 10	3	5	1/50
3	1 à 1 p. 10	4	5	1/100
4	2 à 1 p. 30	3	5	1/150
5	0,5 à 1 p. 10	4,5	5	1/200
6	1 à 1 p. 30	4	5	1/300
7	0,25 à 1 p. 10	4,75	5	1/400
8	0,2 à 1 p. 10	4,8	5	1/500

subir deux passages sur cobayes, nous avons obtenu des toxines contenant 100 à 300 doses mortelles (D. M.) par centimètre cube. Voici, en effet, la toxicité de quelques-uns des liquides de centrifugation alors titrés.

Le 6 novembre 1937, nous avons préparé, à partir du bouillon glucosé à 2 p. 1.000, une toxine liquide qui a tué la souris à la dose de 1/200 de centimètre cube et, avec le même bouillon glucosé à 10 p. 1.000, une toxine qui a tué au 1/300 de centimètre cube. (Dans ces expériences, la centrifugation de la culture a été effectuée quarante-deux heures après l'ensemencement.)

Le 18 avril 1938, les bouillons glucosés à 2 et à 5 p. 1.000, centrifugés après quarante-deux heures d'étuve, ont fourni des toxines contenant 150 à 200 D. M. par centimètre cube. La toxicité de la préparation du 27 juin 1938 (Vf glucosé à 10 p. 1.000) a été comprise entre 1/100 et 1/200 de centimètre cube.

2^o Depuis que nous réalisons l'ensemencement des bouillons avec la souche qui n'a pas subi de passages sur cobayes depuis 1917, nous obtenons des toxines qui contiennent 100 à 400 doses mortelles par centimètre cube. En effet, parmi 35 préparations effectuées en flacons de 5 litres :

9 ont titré 100 à 200 D. M. par centimètre cube.

14 ont titré 200, 250 ou 250 à 300 D. M. par centimètre cube.

11 ont titré 300 ou 300 à 400 D. M. par centimètre cube.

1 a titré 400 D. M. par centimètre cube.

Exemples : la toxicité des préparations du 5 mai, des 13, 17 et 26 juin 1939, a été de 200 à 300 D. M. par centimètre cube après quarante-deux heures d'étuve, dans les bouillons glucosés à 5 p. 1.000. Après vingt-deux à vingt-six heures d'étuve à 37°, nous avons obtenu dans les bouillons également glucosés à 5 p. 1.000 :

	D. M. par centimètre cube
Le 26 mars et le 5 avril 1940	250
Le 27 février et le 23 avril 1940	250-300
Le 5 septembre, le 28 décembre 1939, le 31 janvier 1940 . .	300
Le 17 janvier, les 7 et 21 mai et le 2 juin 1940 (14) . . .	300-400

Signalons que le pH des cultures centrifugées au cours de ces diverses préparations a varié entre 5,3 et 6,3.

Ajoutons aussi que le *pouvoir antigène* de nos échantillons de toxine est intense : injectés à doses croissantes, tous les sept jours, à des chevaux ayant préalablement reçu trois vaccinations d'anatoxine vibrion septique faites à sept jours d'intervalle (15), ils nous ont permis d'obtenir, au bout de six à huit semaines, des sérums contenant, par centimètre cube :

UNITÉS ANTITOXIQUES
internationales

300 à 400	Chevaux 71, 72, 73, 74.
400	Cheval 42.
400 à 500	Cheval 44.
500 à 600	Cheval 50.

Les animaux qui ont atteint un tel degré d'immunisation subissent alors, tous les mois, deux saignées de 6 litres et deux injections sous-cutanées de toxine vibrion septique pré-

(14) Les toxines du 23 avril, des 7 et 21 mai, du 2 juin 1940 sont obtenues à partir d'un bouillon fait le 17 avril 1940 et alors divisé en quatre parties ; chaque partie a été ajustée à pH 7,7-7,8 et glucosée à 5 p. 1.000 un ou deux jours avant d'être utilisée pour préparer l'une des toxines mentionnées. Le titre des 4 toxines obtenues indique que la valeur nutritive du bouillon Vf se maintient au cours du vieillissement.

(15) Doses d'anatoxine injectées : 25, 50, 100 cent. cubes. Doses successives de toxine vibrion septique ultérieurement injectées : 10, 25, 50, 100, 200, 300, 350, 400, 500 cent. cubes (injections sous-cutanées) ; titre des toxines généralement employées : 150 et 200 doses mortelles par centimètre cube.

lablement titrée par la méthode des injections intraveineuses à la souris. Malgré les saignées, le degré d'immunisation augmente généralement, atteint un maximum, puis reste fréquemment intense pendant plusieurs mois avant de diminuer notablement. Voici, sept à douze mois après le début de l'immunisation, le titre du sérum de quelques chevaux soumis ainsi à deux injections d'entretien suivies de deux saignées mensuelles :

UNITÉS par centimètre cube	
400-600	Chevaux 71, 74.
800	Cheval 41.
800-1.400	Chevaux 44, 50, 526.
1.000	Cheval 70.
1.000-1.200	Cheval 73.
1.200-1.500	Cheval 42.
1.500-1.800	Cheval 72.

Le cheval 850, dont l'immunisation a été commencée le 31 mai 1939, a encore fourni au cours des mois de mai à septembre 1940 du sérum dont le titre a été de 600 à 800, 800 et même 800 à 1.000 unités par centimètre cube.

L'immunisation du cheval 720 a débuté en septembre 1938. Ce cheval procure encore du sérum fortement antitoxique : les saignées des mois d'août et septembre 1940 titraient respectivement 1.200 à 1.500 et 1.200 unités par centimètre cube (16).

Nous avons déterminé parallèlement le titre antitoxique et le titre agglutinant (17) de quelques-uns de ces sérum :

	TITRE ANTITOXIQUE (unités)	TITRE AGGLUTINANT
Sérum 720	600	5.000
Sérum 42 et 72.	800 à 1.000	5.000

(16) Le titre du sérum de tous les chevaux mentionnés est déterminé vis-à-vis d'une « dose-test internationale » de l'échantillon de toxine vibrion septique V 5 ; cette « dose-test » représente 46 doses mortelles de toxine pour la souris (injections intraveineuses).

(17) Pour déterminer le titre agglutinant d'un sérum nous utilisons les microbes d'une culture de vingt-quatre heures, séparés par centrifugation puis mis en suspension dans de l'eau physiologique. Dans une série de tubes nous introduisons 2 c. c. 5 de cette suspension et 0 c. c. 2,

Les toxines conservées au frigidaire depuis quatre à six mois permettent de maintenir à un taux élevé le degré d'immunisation des chevaux, c'est dire la stabilité de leur pouvoir antigène.

Jusqu'ici nous n'avons mesuré *directement* ni la valeur antigène des échantillons d'anatoxine que nous avons employés pour commencer l'immunisation des chevaux, ni celle des toxines qui ont déterminé l'hyperimmunisation. Grâce à la méthode rapide de la flocculation mise au point par M. Ramon (18) nous espérons pouvoir à l'avenir réaliser de telles déterminations.

b) DOSE MINIMA MORTELLE DE LA TOXINE PRÉCIPITÉE. — Les résultats du tableau I montrent que les valeurs de la dose minima mortelle (D. M. M.) de 14 échantillons de toxine précipitée par le sulfate d'ammonium sont comprises entre 0 milligr. 043 et 0 milligr. 09 (dose minima mortelle moyenne de ces 14 échantillons : 0 milligr. 069).

Ainsi, le 18 avril 1938, les D. M. M. des toxines préparées à partir des bouillons glucosés à 2 et 10 p. 1.000 ont été respectivement de 0 milligr. 03 et 0 milligr. 045 ; le 6 novembre 1937 nous avons obtenu, par litre de bouillon glucosé à 2 p. 1.000, 7 gr. 250 de toxine sèche et, par litre de bouillon glucosé à 10 p. 1.000, 12 gr. 500 de toxine ; la valeur de la D. M. M. de ces deux toxines a été de 0 milligr. 08.

Le 25 octobre 1939, nous avons ensemencé du bouillon glucosé à 5 p. 1.000 : une partie a été maintenue à 37° pendant vingt-six heures, l'autre partie pendant quarante-deux heures. Nous avons précipité, par litre de culture centrifugée vingt-six heures après l'ensemencement, 18 gr. 250 de toxine et, par litre de culture centrifugée quarante-deux heures après l'ensemencement, 13 gr. 500 de toxine ; dose minima mor-

0 c. c. 1, 0 c. c. 05 du sérum à titrer pur ou convenablement dilué. Nous laissons les tubes pendant quatre heures à 37° puis à la température du laboratoire. Nous notons les résultats le lendemain. Si 0 c. c. 05 de sérum dilué à 1 p. 100, c'est-à-dire 0 c. c. 0005 de sérum, détermine l'agglutination de 2 c. c. 5 de la suspension de vibron septique, la suspension microbienne contient par centimètre cube $\frac{0,0005}{2,5} = \frac{1}{5.000}$ cent. cube du sérum antivibron septique examiné ; le titre agglutinant du sérum est de 5.000.

(18) RAMON (G.). *Rev. d'Immunologie*, 6, 1940, p. 65 à 85.

telle des 2 échantillons de toxine ainsi préparés : 0 milligr. 03.

La dose minima mortelle des toxines obtenues est de :

0 milligr. 073 à partir des bouillons glucosés à 2 p. 1.000.

0 milligr. 066 à partir des bouillons glucosés à 5 p. 1.000.

0 milligr. 07 à partir des bouillons glucosés à 10 p. 1.000.

Sachant que le poids moyen de toxine précipitée par *centimètre cube* de bouillon est de 6 milligr. 950, 41 milligr. 980 et 9 milligr. 830 suivant que le bouillon est glucosé à 2, 5 ou 10 grammes p. 1.000 (voir p. 117), le nombre moyen de doses mortelles respectivement contenues dans ces toxines précipitées est de 93, 180 et 140. En présence de ces résultats, nous avons adopté comme concentration optima du glucose dans le bouillon Vf ordinaire, la concentration de 5 p. 1.000.

c) **POUVOIR ANTIGÈNE DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE PRÉCIPITÉE.** — G. Ramon a montré que l'organisme animal produit plus abondamment des antitoxines diphtérique et tétanique lorsque l'antigène injecté est mélangé au préalable avec une substance non spécifique, avec de la lanoline par exemple.

Nous avons constaté (19) que les injections de petites quantités de toxine vibrion septique précipitée par le sulfate d'ammonium et enrobée dans la lanoline déterminent chez le cheval une immunisation intense (la toxine précipitée est dissoute dans quelques centimètres cubes de toxine liquide centrifugée avant de l'incorporer à la lanoline).

Aux derniers chevaux que nous avons immunisés par ce procédé, nous avons successivement injecté les doses suivantes de toxine : 100, 250, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 doses mortelles. Aux chevaux d'une autre série nous avons injecté 100, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000 puis 5.000 doses mortelles de toxine ; il est bien entendu que la dose mortelle de ces toxines précipitées et desséchées est toujours déterminée sur souris. Signalons aussi que nous ajoutons au mélange de toxine et de lanoline les microbes de 5 cent. cubes, puis de 10 cent. cubes et ensuite de 15 cent.

(19) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 719.

cubes de culture de vingt-quatre heures de vibron septique (20). Les injections aux chevaux sont faites tous les quatorze jours jusqu'au moment où un titrage d'épreuve indique que le cheval présente un degré suffisant d'immunisation et peut, dès lors, être soumis à deux saignées mensuelles de 6 litres de sang ; le cheval ne reçoit ensuite qu'une seule injection par mois suivie de 2 saignées. Les titrages successifs indiquent que l'immunisation, après avoir atteint un maximum, diminue, puis se stabilise à un taux moyen que l'on ne peut notablement éléver, même si l'on inocule, chaque mois, jusqu'à 12.000 doses mortelles de toxine au lieu de 5.000.

(20) L'adjonction de germes microbiens permet de renforcer l'immunisation déclenchée par les injections répétées de toxine correspondante enrobée dans la lanoline. Nous avons vérifié ce fait au cours d'expériences comparatives sur lapins. Comme exemple nous donnerons les résultats que nous avons obtenus en immunisant 15 lapins répartis en trois lots de 5, auxquels nous avons respectivement injecté les mélanges suivants : premier lot, lanoline + toxine *perfringens* ; deuxième lot, lanoline + toxine *perfringens* + bacilles *perfringens* de 0 c. c. 5 à 2 cent. cubes de culture de vingt-quatre heures ; troisième lot, eau physiologique + toxine *perfringens* + bacilles *perfringens*. Ces mélanges ont été injectés dès qu'ils ont été préparés. Les doses de toxine injectées à chaque lapin ont été successivement de : 20, 40, 100, 150, 200, 300, 300, 300 doses mortelles. La première injection sous-cutanée a été faite le 7 décembre 1937 et les suivantes tous les quatorze jours. Les déterminations du titre antitoxique des sérums ont été effectuées vis-à-vis d'une « dose-test internationale » de la toxine E₁₄. Les titres antitoxiques et agglutinants des sérums prélevés neuf jours après la troisième injection ont été généralement plus élevés que ceux des sérums examinés neuf jours après la cinquième injection et neuf jours après la huitième. Les meilleurs résultats ont été fournis par le deuxième lot de lapins. En effet :

Premier lot : titre antitoxique maximum d'un sérum : 50 à 100 unités ; titre agglutinant : 100.

Deuxième lot : titre antitoxique maximum d'un sérum : 200 à 300 unités ; titre agglutinant : 100 à 200.

Troisième lot : titre antitoxique maximum d'un sérum : 100 à 200 unités ; titre agglutinant : 100.

Dans deux autres séries d'essais analogues, commencés respectivement le 17 et le 31 mai 1938, les mélanges à injecter ont été préparés soit cinq heures, soit vingt-quatre heures avant l'inoculation. Dans ces cas encore les meilleurs sérums ont été obtenus chez les lapins immunisés avec le mélange : lanoline + toxine + *B. perfringens*.

Les recherches comparables faites avec les antigènes du vibron septique indiquent, d'une part, que l'antitoxine vibron septique apparaît lentement et en plus faible quantité chez le lapin que l'antitoxine *perfringens* et, d'autre part, que les injections de toxine vibron septique et de vibrons septiques sont rapidement mortelles en l'absence de lanoline.

Par contre, si l'on remplace chez de tels chevaux l'injection mensuelle de toxine précipitée englobée dans la lanoline par une ou deux injections sous-cutanées de toxine liquide, on accentue nettement l'immunisation pendant quelques mois, même lorsque la toxine liquide employée présente, intentionnellement, un titre faible. Nous avons noté ce fait dans 11 cas sur 12. Nous en citerons deux exemples :

Premier exemple : le sérum du cheval 350 immunisé par le procédé à la lanoline atteint le titre de 800-850 unités antitoxiques neuf jours après la cinquième injection, c'est-à-dire soixante-cinq jours après la première. L'immunisation cesse ensuite de croître, faiblit graduellement, puis, pendant la période de stabilisation de l'immunité, le titre du sérum se situe entre 200 et 300 unités. On effectue alors à ce cheval des injections de toxine vibron septique liquide contenant seulement 20 doses mortelles par centimètre cube. Voici les doses de toxine successivement injectées et le titre du sérum provenant de la saignée de 6 litres faite neuf jours après la dernière injection (21) :

Premier mois : le 9 novembre 1938, le cheval reçoit une injection de 50 cent. cubes de toxine et, sept jours après, une injection de 100 cent. cubes ; titre du sérum neuf jours plus tard : 400 unités.

Deuxième mois : doses de toxine injectées à sept jours d'intervalle : 100 et 300 cent. cubes ; titre du sérum : 400 unités.

Troisième mois : doses de toxine injectées à sept jours d'intervalle : 200 et 400 cent. cubes ; titre du sérum : 300 unités.

Deuxième exemple : cheval 369 ; neuf jours après la cinquième injection de toxine + lanoline + microbes vivants, le sérum titre 500 à 550 unités (titrage avec l'échantillon de toxine V 2). L'immunisation ne dépasse pas ce niveau pendant les semaines suivantes : après une période de diminution progressive, le taux des anticorps dans le sérum se stabilise : les valeurs antitoxiques varient alors entre 200 et 300, 100 et 200 unités. L'injection mensuelle de toxine + lanoline + microbes est alors remplacée par une seule injection de toxine liquide et le sérum est titré, neuf jours après l'injection, avec une « dose-test » de l'échantillon de toxine V 5.

Premier mois : le 5 avril 1939, le cheval reçoit une seule injection de 200 cent. cubes de toxine contenant 25 doses mortelles par centimètre cube ; neuf jours plus tard le titre du sérum est de 500-600 unités.

Deuxième mois : on effectue une injection de 400 cent. cubes contenant 25 doses mortelles par centimètre cube.

Troisième mois : injection de 500 cent. cubes de toxine contenant 100 doses mortelles par centimètre cube ; titre du sérum : 500-600 unités.

Quatrième et cinquième mois : injection de 500 cent. cubes de toxine contenant 100 doses mortelles par centimètre cube.

(21) Tous ces titrages ont été effectués avec une « dose-test » internationale de l'échantillon de toxine vibron septique V 2.

Sixième mois : injection de 500 cent. cubes de toxine contenant 200 doses mortelles par centimètre cube ; titre du sérum : 400-500 unités par centimètre cube.

Septième mois : injection de 500 cent. cubes de toxine contenant 200 doses mortelles par centimètre cube ; titre du sérum 400 unités par centimètre cube.

d) STABILITÉ DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE LIQUIDE OU PRÉCIPITÉE. — La toxicité des différents échantillons de toxine vibrion septique liquide, conservés par quantités de 5 litres dans des flacons soigneusement bouchés, reste stable à 2° pendant au moins cinq semaines (pH de ces échantillons : 5,3-5,4).

Après une heure de chauffage à 100°, les toxines liquides perdent leur nocivité. Exemple : la toxine du 26 juin 1939, préparée dans du bouillon glucosé à 5 p. 1.000, contenait avant chauffage 250 à 300 D. M. M. par centimètre cube ; après chauffage en tube scellé, elle ne déterminait plus la mort des souris à la dose de 0 c. c. 5.

A l'état sec, la toxine vibrion septique que nous avons préparée s'est maintenue parfaitement stable à 2°. La toxicité de l'échantillon V 2, préparé depuis quatre ans, n'a pas encore diminué.

**2° DOSE MINIMA MORTELLE DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE
OBTENUE DANS LE BOUILLON Vf ORDINAIRE
ADDITIONNÉ DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES:**

Dans le but d'augmenter la production de la toxine vibrion septique dans le bouillon Vf ordinaire, nous avons ajouté aseptiquement à ce bouillon, aussitôt après l'avoir ensemencé, soit une solution de phosphate bipotassique, soit un mélange fraîchement préparé de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude, soit une solution d'acide ascorbique (vitamine C). Ces différentes solutions ont été préparées et filtrées sur bougie stérile juste avant l'emploi. Les quantités employées par litre de bouillon ont été, dans le premier cas, de 5 grammes de PO₄ HK₂, en solution dans 30 cent. cubes d'eau distillée ; dans le deuxième cas, de 5 ou 8 grammes de PO₄ HK₂ et de 2 grammes de pyruvate de soude en solution dans 30 cent. cubes d'eau distillée ; dans le troisième cas, de 0 gr. 15 ou

de 0 gr. 23 d'acide ascorbique en solution à 1 p. 100. Pour réaliser ces essais, nous avons procédé de la manière suivante : du bouillon Vf, ajusté à pH 7,7-7,8 et glucosé à 2 ou 3 grammes par litre, est réparti dans des tubes droits de 50 cent. cubes ou dans des flacons en verre pyrex de 5 litres, puis stérilisé. Avant l'ensemencement, les tubes ou les flacons sont préalablement portés à 100° pour chasser l'air, puis rapidement amenés à 37°. Aussitôt après l'ensemencement, une partie de ceux-ci est additionnée d'acide ascorbique ou des solutions-tampon à étudier.

a) TOXINOGÉNÈSE EN PRÉSENCE DE PHOSPHATE BIPOTASSIQUE ET DE PYRUVATE DE SOUDE. — Nous spécifions dans le tableau III le temps pendant lequel les bouillons ensemencés sont laissés à l'étuve, le pH des cultures centrifugées vingt-six ou quarante-deux heures après l'ensemencement, ainsi que le titre des toxines obtenues comparativement en bouillon Vf ordinaire et en bouillon Vf additionné de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude.

Les résultats des 17 expériences signalées dans ce tableau indiquent, d'une part, que les pH des cultures réalisées dans les bouillons sans tampon varient entre 5,4 et 6,3 et ceux des cultures effectuées dans les bouillons tamponnés entre 5,9 et 6,8, et, d'autre part, que le mélange de phosphate et de pyruvate exerce une action favorisante marquée sur la production de la toxine dans 10 cas sur 17.

Ainsi dans l'expérience du 30 mai 1939, la toxicité des cultures effectuées dans des tubes de 50 cent. cubes et centrifugées après quarante-deux heures d'étuve était la suivante :

	D. M. par centimètre cube
Cultures en bouillon Vf	150 à 200
Cultures en bouillon Vf tamponné	200 à 250

Dans l'expérience du 18 juillet 1939 (cultures en flacons de 5 litres et centrifugation au bout de quarante-deux heures d'étuve), nous avons constaté que la toxine en bouillon Vf titre 100 à 150 D. M. par centimètre cube et la toxine en bouillon tamponné 200 à 250 D. M. par centimètre cube.

Dans l'expérience du 30 août 1939, nous avons observé des

TABLEAU III. — Titre de la toxine vibrion septique préparée dans du bouillon Vf additionné ou non d'un mélange-tampon.

DATE DE L'EXPÉRIENCE	VOLUME ENSEMENCÉ	GLUCOSE PAR LITRE (grammes)	DURÉE D'INCUBATION (heures)	BOUILLON Vf ordinaire		BOUILLON Vf tamponné	
				pH après culture	D.M.M. par centimètre cube	pH après culture	D.M.M. par centimètre cube
10 mars 1939	40 c.c. par tube.	2	42	5,6	50	6,4	100
20 mars 1939	40 c.c. par tube.	2	42	6,3	50	6,6	200
1 ^{er} avril 1939	4 l. par flacon.	2	42	6,3	100	6,7	400-150
30 mai 1939	40 c.c. par tube.	2	42	5,9	100-150	6,8	100-150
5 mai 1939	4 l. par flacon.	5	42	5,4	200-250	5,9	250-300
30 mai 1939	40 c.c. par tube.	5	42	5,4	150-200	5,85	200-250
13 juin 1939	40 c.c. par tube.	5	42	5,5	250	5,7	250
17 juin 1939	4 l. par flacon.	5	42	5,4	300	5,7	400
20 juin 1939	40 c.c. par tube.	5	42	5,6	125-150	6	175
26 juin 1939	40 c.c. par tube.	5	42	5,3	200-250	6	250-300
18 juillet 1939	4 l. par flacon.	5	42	5,4	100-150	6,3	200-250
28 juin 1939	40 c.c. par tube.	5	35		200		200
30 juin 1939	40 c.c. par tube.	5	30		150-200		250
29 août 1939	4 l. par flacon.	5	26	5,4	125	5,8-5,9	200-250
30 août 1939	4 l. par flacon.	5	26	5,4	150	5,8	200-250
3 sept. 1939	4 l. par flacon.	5	26	5,6	200	6,15	200
6 sept. 1939	4 l. par flacon.	5	26	5,6	250-300	6,15	250
5 sept. et 11 oct. 1939.	4 l. par flacon.	5	22		300		
31 oct. et 7 nov. 1939.	4 l. par flacon.	5	22		200-300		
28 déc. 1939	4 l. par flacon.	5	22		300		
17 janv. 1940	4 l. par flacon.	5	22		300-400		
27 fév. 1940	4 l. par flacon.	5	22		200-300		
13 mars 1940	4 l. par flacon.	5	22		400		
26 mars et 8 avril 1940.	4 l. par flacon.	5	22		250		
23 avril 1940	4 l. par flacon.	5	22		250-300		
7 et 21 mai 1940.	4 l. par flacon.	5	22		300-400		
2 juin 1940	4 l. par flacon.	5	22		350-400		

Résultats tout à fait analogues : le titre des toxines préparées dans des flacons de 5 litres et centrifugées après vingt-six heures d'étuve seulement a été le suivant :

D. M.
par centimètre cube

Cultures en bouillon Vf 150
 Cultures en bouillon Vf + phosphate + pyruvate 200-250

Dans l'essai du 20 mars, les cultures centrifugées après

quarante-deux heures d'étuve avaient tué la souris aux doses suivantes :

	CENTIMÈTRE CUBE
Bouillon Vf	1/50
Bouillon Vf + phosphate	1/100
Bouillon Vf + phosphate + pyruvate	1/200

L'effet favorable exercé sur l'élaboration de la toxine par le mélange de *phosphate* et de *pyruvate* n'a pas toujours été aussi intense que dans ces quatre expériences. Dans celles du 3 mai et du 26 juin, l'action favorisante a été faible. Dans les essais du 13 et du 28 juin, des 3 et 6 septembre, nous n'avons pas décelé d'amélioration de la toxinogénèse dans les bouillons ainsi tamponnés.

Pour expliquer les résultats négatifs ou faiblement positifs de ces expériences, notés trente à quarante-deux heures après l'ensemencement, nous avons envisagé l'hypothèse de l'atténuation progressive de la toxine dans les bouillons tamponnés, bouillons qui se caractérisent par un développement précoce de la culture. Dans le but de rechercher si la toxine s'atténue notablement à 37° à partir du moment où elle a atteint son titre maximum, et si ce phénomène éventuel de l'atténuation de la toxine intervient dans les bouillons tamponnés et amoindrit l'effet présumé du tampon avant que les cultures réalisées dans les bouillons témoins aient présenté leur toxicité maxima, nous avons entrepris de déterminer, au cours du développement, la toxicité des cultures effectuées comparativement dans des bouillons tamponnés ou non : nous avons centrifugé celles-ci au bout de seize, vingt, vingt-quatre et quarante-deux heures d'étuve à 37° et évalué aussitôt sur souris, par voie veineuse, le titre des toxines ainsi obtenues. Nous avons utilisé des bouillons Vf glucosés à 5 p. 1.000 et employé le mélange-tampon, phosphate + pyruvate, dans les mêmes conditions que précédemment. Nous rapportons quelques-uns de nos résultats dans le tableau IV.

Examinons-les rapidement aux points de vue suivants :

- α) Action du tampon sur la toxinogénèse ;
- β) Vitesse de formation et stabilité de la toxine à 37° . . .
- γ) Action du tampon sur la toxinogénèse. — Les expériences

TABLEAU IV. — Toxicité, au cours de l'incubation, des cultures de *vibron septique* effectuées dans du bouillon Vf glucosé à 5 p 1.000 additionné ou non de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude ou d'acide ascorbique.

EXPÉRIENCE	VOLUME ensemencé	DURÉE d'étuve à 37° (heures)	TITRE DE LA TOXINE préparée dans du bouillon		
			Vf ordinaire	Vf tamponné par phosphate + pyruvate	Vf + acide ascorbique
13 juin 1939	40 c. c.	24	250-300	250-300	
	40 c. c.	30	250		
	40 c. c.	42	250	250	
20 juin 1939	40 c. c.	24	150	175	
	40 c. c.	42	125-150	175	
26 juin 1939	40 c. c.	16	300	300-350	200
	40 c. c.	20	300	250-300	200-250
	40 c. c.	24	200-250	250-300	200
	40 c. c.	42	200-250	250-300	200
11 juillet 1939	40 c. c.	16	100	100-125	25-50
	40 c. c.	20	100-125	100	25-50
	40 c. c.	24	100-125		25-50
25 octobre 1939	4 l.	24	400		
	4 l.	42	300		

du tableau IV indiquent les faits suivants : seize heures après l'ensemencement, le bouillon tamponné est légèrement plus toxique que le bouillon ordinaire. Vingt et vingt-quatre heures après l'ensemencement, la toxicité du bouillon Vf tamponné n'est supérieure que dans la moitié des cas à celle du bouillon témoin ; dans l'essai du 26 juin, par exemple, la toxine s'étant atténuée dans le bouillon tamponné entre la seizième et la vingtième heure d'étuve, l'effet favorisant du mélange-tampon, appréciable après seize heures d'étuve, n'apparaît plus vingt heures après l'ensemencement.

De ces déterminations il ressort que le bouillon Vf additionné de phosphate bipotassique et de pyruvate de sodium ne contient pas d'une manière constante plus de toxine que le bouillon ordinaire, même lorsque les titrages sont effectués vingt et vingt-quatre heures après l'ensemencement. Les résultats positifs obtenus après seize heures d'étuve incitent

à rechercher la toxicité des cultures après un temps d'incubation très court, au bout de huit et douze heures par exemple.

β) *Vitesse de formation de la toxine vibrion septique à 37°.* — 1° *Bouillon Vf ordinaire.* — Rappelons brièvement que Weinberg et Séguin ont utilisé une période d'incubation de trente-six à quarante heures à 37° pour préparer leurs échantillons de toxine vibrion septique dans du bouillon Martin, glucosé à 0,5 p. 1.000 (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 80, 1917, p. 718). L'usage s'est ensuite établi dans leur laboratoire de centrifuger au bout de quarante heures environ les toxines vibrion septique réalisées dans du bouillon Vf glucosé à 2 p. 1.000.

Karube (1934) a observé le maximum de toxicité après seize à vingt heures d'étuve à 37° dans des bouillons de veau très glucosés et Walbum et Reymann après trente-deux à quarante heures à 37° dans des bouillons de veau additionnés de 10 p. 1.000 de peptone et de 10 p. 1.000 de glucose.

Dans nos essais, réalisés avec du bouillon Vf ordinaire glucosé à 5 p. 1.000, le titre des toxines centrifugées après vingt-quatre heures d'étuve à 37° a été aussi élevé, sinon plus, que celui des toxines centrifugées après quarante-deux heures d'étuve à la même température (tableau IV). Les chiffres des expériences du 26 juin et du 11 juillet de ce tableau montrent même que le titre des toxines centrifugées après vingt heures d'étuve seulement est égal ou supérieur à celui des toxines centrifugées après vingt-quatre heures. Ainsi, dans l'expérience du 26 juin, les toxines élaborées au bout de vingt et vingt-quatre heures d'étuve dans le bouillon Vf ordinaire titrent respectivement 300 et 200 à 250 doses mortelles par centimètre cube. Enfin, si nous considérons les résultats des titrages effectués après seize et vingt heures d'étuve, au cours des deux expériences précédentes, nous voyons que dans la première (expérience du 26 juin), on a autant de toxine au bout de seize heures qu'au bout de vingt : 300 D. M. M. par centimètre cube et que, dans la deuxième (expérience du 11 juillet), la toxicité des cultures centrifugées après vingt heures d'étuve n'est que légèrement supérieure à celle des cultures titrées seize heures après l'ensemencement. Les résultats de ce dernier essai montrent toutefois qu'il vaut

mieux attendre la vingtième heure d'étuve pour centrifuger les cultures en bouillon Vf glucosé à 5 p. 1.000.

Ces expériences précisent la notion de la grande rapidité avec laquelle la toxine vibrion septique est élaborée dans le bouillon Vf. Ils montrent que dans ce bouillon, amené à pH 7,7-7,8 et glucosé à 5 p. 1.000 avant la stérilisation, la quantité de toxine élaborée en seize heures à 37°, en l'absence de substances-tampon, peut atteindre le taux de 300 D. M. M. par centimètre cube (titrages sur souris de 17 à 20 grammes, voie veineuse).

Les résultats des titrages effectués comparativement vingt-quatre et quarante-deux heures après l'ensemencement (tableau IV, expériences des 13 et 20 juin et du 25 octobre 1939) attestent que la toxine vibrion septique ne s'atténue que faiblement à 37° entre la vingt-quatrième et la quarante-deuxième heure d'étuve. L'affaiblissement le plus intense que nous ayons constaté entre ces limites a été de 25 p. 100 (expérience du 25 octobre) ; au cours de cet essai, le titre des toxines liquides a été de 400 D. M. M. par centimètre cube au bout de vingt-quatre heures et de 300 seulement au bout de quarante-deux heures d'étuve. Signalons aussi le fait observé dans cette expérience : tandis que nous avons précipité, au moyen de sulfate d'ammonium, 18 gr. 250 de toxine par litre de culture centrifugée après vingt-quatre heures d'étuve, nous n'avons précipité que 13 gr. 500 de toxine par litre au bout de quarante-deux heures d'étuve (dose minima mortelle de la toxine précipitée dans ces 2 cas : 0 milligr. 03) ; ce qui amène à conclure qu'il est préférable de ne pas trop prolonger la durée d'incubation à 37°. Actuellement nous centrifugeons vingt à vingt-deux heures après l'ensemencement les cultures de vibrion septique effectuées à cette température dans du bouillon Vf ordinaire glucosé à 5 p. 1.000.

2° *Bouillons Vf additionnés d'une solution-tampon.* — Deux expériences du tableau IV réalisées avec du bouillon Vf additionné de phosphate et de pyruvate indiquent que la toxicité des cultures titrées seize heures après l'ensemencement est plus élevée que celle des cultures éprouvées vingt heures après l'ensemencement. Nous n'avons pas évalué la toxicité des

cultures après une durée d'étude plus courte. Il serait intéressant, tant au point de vue théorique que pratique, de préciser si la toxicité des cultures atteint sa valeur maxima au bout d'un temps inférieur à seize heures dans des bouillons aussi favorables à la multiplication rapide de la semence que le sont les bouillons Vf tamponnés. Le procédé du titrage de la toxine par la méthode de la flocculation de G. Ramon permettra aisément de réaliser ces recherches.

b) TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C). — D'après les expériences d'Arloing, Morel, Josserand et Thévenot (22), le complexe Fer-ascorbique accentue la gravité de la gangrène expérimentale provoquée, chez le cobaye et le lapin, par injection intramusculaire de culture de vibrion septique. Arloing, Morel, Josserand, Thévenot et Caille (23) ont signalé que l'acide ascorbique stimule, en vertu de son effet oxydo-réducteur, les processus fermentatifs ; M. Catz (24) a montré que l'addition d'acide ascorbique au bouillon ordinaire et au bouillon Vf permet la culture du vibrion septique dans des conditions aérobies.

Par contre, A. Büller Souto et C. Lima (25) ont constaté que la vitamine C, ajoutée à une solution de toxine vibrion septique atténue la toxicité de la solution et que l'action neutralisante de la vitamine augmente avec le temps. Patocka et Ilavsky (26), dans leur essai de préparation de la toxine vibrion septique dans du bouillon ordinaire additionné d'acide ascorbique, ont constaté que cette substance est défavorable à la production de la toxine.

Dans nos expériences, l'acide ascorbique, ajouté à la dose de 0 gr. 15 ou de 0 gr. 25 par litre de bouillon Vf, n'a pas favorisé la formation de la toxine vibrion septique dans 9 cas sur 10.

Nous avons indiqué dans le tableau IV les résultats de deux essais au cours desquels nous avons déterminé, après seize,

(22) ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.) et THÉVENOT (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 347.

(23) ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.), THÉVENOT (L.) et CAILLE (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 349.

(24) CATZ (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 516.

(25) BÜLLER SOUTO (A.) et LIMA (C.). *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, p. 79.

(26) PATOCKA (F.) et ILAVSKY (J.). *Ces Annales*, **62**, 1939, p. 310.

vingt, vingt-quatre heures et, dans 1 cas, après quarante-deux heures d'étuve, le titre des toxines préparées comparativement dans des bouillons Vf glucosés à 5 p. 1.000, additionnés ou non d'acide ascorbique. Dans l'essai du 26 juin, l'acide ascorbique diminue légèrement la toxinogenèse. Dans l'expérience du 11 juillet, il exerce une action défavorable intense : alors que le titre des toxines formées dans le bouillon Vf ordinaire est de 100 ou 100 à 125 doses mortelles par centimètre cube, celui des toxines préparées dans le bouillon additionné d'acide ascorbique n'est que de 25 à 50 doses mortelles par centimètre cube.

c) TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE DE SANG DESSÉCHÉ. — Le sang desséché de cheval, fréquemment ajouté aux doses de 1 à 2 grammes par litre dans les bouillons utilisés au cours de la préparation de la toxine tétnique (27), nous a permis d'améliorer, dans 7 cas sur 8, la production de la toxine *perfringens* dans le bouillon Vf de bœuf, glucosé à 1 p. 1.000 (28) ; nous

(27) RAMON (G.). *Revue d'Immunol.*, 6, 1940, p. 74.

(28) GUILLAUME (Maylis). Ces *Annales*, 66, 1941, p. 231. Dans ces recherches, le bouillon Vf de bœuf additionné de 1 ou 1,5 p. 1.000 de sang desséché a fourni environ une fois et demie plus de toxine que le même bouillon non additionné de sang : titre maximum des toxines obtenues en présence de sang, au cours de ces expériences réalisées avec des bouillons moyennement nutritifs : 45 doses mortelles par centimètre cube.

Dans les 5 premiers bouillons Vf que nous avons préparés avec de la viande et du foie de cheval — et que nous avons ajustés à pH 7,7-7,8 avant de les glucosier à 1 p. 1.000 et de les stériliser — nous n'avons obtenu que des toxines *perfringens* de titre faible : 5 ou 10 doses mortelles par centimètre cube ; après addition de sang desséché, ces mêmes bouillons nous ont permis d'obtenir des toxines de titre deux à trois fois plus élevé.

A présent, nous ajoutons systématiquement cette substance aux bouillons Vf de cheval, ajustés à pH 7,65 avant la stérilisation et glucosés à 1 p. 1.000 ; le titre des 8 dernières toxines que nous avons successivement préparées dans ces conditions a été de : 30, 60, 35 à 40, 50 à 60, 70, 50 à 60, 50 et 60 à 70 doses mortelles par centimètre cube. Signalons que ces bouillons additionnés de 2 p. 100 de diverses peptones commerciales ne permettent pas de préparer de meilleures toxines *perfringens* que les bouillons + sang desséché. (Les peptones pancréatiques Defresne, 5 B ou 5 C des Laboratoires Vaillant, essayées comparativement, nous ont fourni sensiblement les mêmes résultats.) Ajoutons qu'un chauffage à 100° fait totalement disparaître les propriétés toxiques et hémolytiques de la toxine *perfringens* préparée dans ces divers bouillons.

avons recherché s'il favoriserait aussi l'élaboration de la toxine vibrion septique dans le même bouillon, glucosé à 5 p. 1.000. Nous avons effectué cinq essais. Dans les deux premiers nous avons employé le sang à la concentration de 1 gramme par litre de bouillon, dans les trois autres à la concentration de 1,5 p. 1.000 ; dans tous les cas il a suscité le développement rapide de la semence. Le titre des toxines obtenues dans ces bouillons n'a été qu'une seule fois supérieur à celui des toxines formées dans le bouillon témoin et, de plus, cette action a été faible : en effet, le titre de la toxine préparée dans le bouillon additionné de 1,5 p. 1.000 de sang a été, dans ce cas, de 200 à 250 D. M. par centimètre cube et celui de la toxine élaborée en l'absence de sang, de 200 D. M. par centimètre cube.

Au cours de deux autres essais, nous avons comparé, vingt-deux heures après l'ensemencement, le titre des toxines obtenues dans les bouillons suivants, glucosés à 5 p. 1.000 : bouillon Vf additionné de 10 ou 20 p. 100 (en volumes) de digestion papaïnique de viande et de foie de bœuf ; bouillon Vf + 10 à 20 p. 100 de la digestion papaïnique précédente + 1,5 p. 1.000 de sang desséché. Voici nos résultats : dans 1 cas, la digestion papaïnique a eu un effet favorable sur la toxinogenèse et dans l'autre cas elle ne l'a pas influencée ; le sang n'a augmenté que dans un cas, et encore légèrement, la production de la toxine vibrion septique dans les bouillons additionnés de digestion papaïnique.

3° DOSE MINIMA MORTELLE DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE PRÉPARÉE DANS DIVERS BOUILLONS.

Sous l'impulsion de M. G. Ramon divers services de l'Institut Pasteur ont remplacé les tissus de veau et de bœuf par ceux de cheval pour préparer les différents bouillons nécessaires à la production de toxines variées.

G. Ramon et M^{le} Amoureux ont signalé (29) que le titre des toxines tétaniques obtenues depuis cette substitution atteint un taux très satisfaisant.

(29) RAMON (G.) et AMOUREUX (Germaine). *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 211, 1940, p. 304.

Pour préparer la toxine du vibrion septique nous avons utilisé des digestions pepsiques de foie seul ou des bouillons faits avec du foie et de la viande de cheval (30).

a) DIGESTION PEPSIQUE DE FOIE. — Cette digestion a été préparée ainsi :

Eau à 47°, 10 litres ; foie passé au broyeur électrique : 2 kilogr. 500 ; pepsine : 6 grammes ; acide chlorhydrique pur et concentré : 100 cent. cubes. La digestion a été arrêtée au bout de vingt et une heures (par un chauffage à 80°), puis le bouillon a été soumis aux mêmes manipulations (31) qu'un bouillon Vf ordinaire (filtration, alcalinisation avec de la soude jusqu'à pH 7,7-7,8, chauffage à 100° suivi d'une filtration, répartition en flacons, addition de 5 grammes de glucose par litre).

Dans quelques flacons nous avons ajouté du sang desséché (1 gr. 5 par litre de bouillon) ou des quantités variables de peptone Defresne (32). Les cultures ont été centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement et les titrages effectués sur souris de 17 à 20 grammes par voie veineuse.

Résultats : Expérience I. — La toxine préparée dans le bouillon de foie a titré 50 à 100 doses mortelles par centimètre cube et celle que nous avons obtenue en présence de sang : 100 à 150 doses mortelles par centimètre cube.

Expérience II. — Titre de la toxine dans le bouillon de foie : 50 à 100 doses mortelles par centimètre cube ; titre de la toxine dans ce bouillon additionné de 1,5 p. 1.000 de peptone Defresne : 150 à 200 doses mortelles par centimètre cube.

Ces chiffres indiquent que le sang desséché ou la peptone Defresne améliorent la valeur d'une digestion pepsique de foie de cheval faiblement nutritive. Le même résultat a été observé au cours d'une expérience faite avec une digestion pepsique de foie de génisse.

(30) Le foie et les muscles sont prélevés à des chevaux producteurs de sérum antitoxiques, morts depuis un ou plusieurs jours.

ZEISSLER (J.) et ROSSFELD (L.), au cours de leurs études sur de nombreux germes anaérobies, ont employé des bouillons de viande de cheval, mais n'ont pas déterminé la toxicité des cultures ainsi obtenues. *Centralb. f. Bakl.*, 410, 1929, p. 24.

(31) Nous les avons décrites dans ces *Annales*, 66, 1941, p. 373.

(32) Peptone pancréatique préparée avec de la viande de cheval par les Laboratoires Vaillant.

Voici le titre de la toxine obtenue :

	D. M. par centimètre cube
Dans le bouillon de foie.	100 à 150
Dans le bouillon de foie + 1,5 p. 1.000 de sang desséché.	150 à 200
Dans le bouillon de foie + 5 p. 1.000 de peptone Defresne.	200
Dans le bouillon de foie + 5 p. 1.000 d'extrait de viande.	200

b) DIGESTION PEPSIQUE DE VIANDE ET DE FOIE DE CHEVAL. —

Nous avons préparé deux sortes de digestions : la première, que nous dénommons Vf de cheval, est en tous points semblable au bouillon Vf ordinaire : pour 20 litres d'eau à 47°, nous employons 4 kilogrammes de viande de cheval, 1 kilogr. 330 de foie, 12 grammes de pepsine en poudre, 200 cent. cubes d'acide chlorhydrique pur et concentré, soit une partie de foie pour trois de viande. La deuxième est faite avec deux fois plus de viande que la digestion précédente, dans le but d'augmenter sa richesse en peptone et éventuellement sa valeur nutritive, afin d'éviter ainsi l'emploi de fortes quantités de peptones commerciales ; nous l'avons désignée par les lettres Wf : à 16 litres d'eau à 47° nous avons ajouté 8 kilogrammes de viande, 1 kilogr. 330 de foie, 20 grammes de pepsine, 200 cent. cubes d'acide chlorhydrique (soit une partie de foie pour six de viande). La durée de la digestion à 47-48° a été, dans l'un et l'autre cas, de vingt-trois heures (33). Les digestions ont été arrêtées, alcalinisées, glucosées à la manière habituelle et, comme dans les expériences précédentes, nous avons recherché si les peptones commerciales ou le sang desséché peuvent accroître la production de la toxine vibrion septique dans ces bouillons étudiés comparativement. Nous avons essayé la peptone Chapoteaut ainsi que deux peptones

(33) Cette durée de digestion est celle que nous avons adoptée pour préparer les bouillons Vf ordinaires, à base de viande et de foie de *bœuf* : elle nous a permis d'obtenir des bouillons de *bœuf* propres à la fois à la préparation des toxines *perfringens*, vibrion septique, histolytique ou *œdematiens* ; de nombreux essais comparatifs nous ont montré que les digestions de vingt à vingt et une heures, aussi favorables à la production des toxines *perfringens* et vibrion septique que les digestions de vingt-trois heures, étaient moins propices que ces dernières à l'obtention des toxines histolytique et *œdematiens*. Nous nous proposons de rechercher si ces observations sont en tous points applicables aux bouillons Vf de cheval.

préparées par les laboratoires Vaillant : la peptone pép-sique P. B. C. et la peptone pancréatique Defresne.

Résultats obtenus avec le bouillon Vf de cheval. — La peptone P. B. C., à la concentration de 5 p. 1.000, n'a aucune influence sur la toxinogenèse. Aux doses de 1 à 5 p. 1.000, la peptone Defresne a augmenté l'élaboration de la toxine de 30 p. 100 environ, dans 4 cas sur 5. La peptone Chapoteaut, ajoutée au bouillon Vf à la concentration de 5 p. 1.000, a permis d'obtenir, dans 5 cas sur 7, une fois et demie à deux fois plus de toxine que dans le bouillon témoin. Dans l'expérience du 16 octobre 1940, la peptone Chapoteaut a été plus favorable que la peptone Defresne. Voici, en effet, le titre des toxines obtenues :

D. M.
par centimètre
cube

Dans le bouillon Vf de cheval.	100
Dans le bouillon Vf de cheval + 5 p. 1.000 peptone Defresne. .	150
Dans le bouillon Vf de cheval + 5 p. 1.000 peptone Chapoteaut. .	200

Dans 2 cas sur 7 la peptone Chapoteaut n'a pas augmenté la valeur nutritive du bouillon Vf. En effet, les toxines obtenues au cours de ces 2 essais ont respectivement titré 250 et 300 D. M. par centimètre cube, que le bouillon Vf employé soit ou non additionné de peptone Chapoteaut.

Les 20 préparations de toxine que nous avons encore effectuées en présence de 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut ont contenu par centimètre cube : 100 à 150 D. M. (cinq fois) ; 150 ou 150 à 200 D. M. (six fois) ; 200, 200 à 250 ou 250 D. M. (neuf fois).

Le pH des toxines centrifugées a varié entre 5,3 et 5,5.

Dans le bouillon Vf de cheval additionné de 1,5 p. 1.000 de sang desséché nous n'avons pas obtenu de meilleure toxine vibrion septique que dans le bouillon témoin. L'ensemble de nos investigations indique donc que le sang desséché n'exerce pas sur la genèse de la toxine vibrion septique dans les bouillons Vf de bœuf ou de cheval la même action stimulante que sur la formation de la toxine *perfringens*. Il est intéressant de rapprocher de cette observation le fait que la toxine élaborée par le vibrion septique dans ces bouillons est beaucoup moins hémolytique que celle du *B. perfringens*. En effet, tandis qu'il faut 0 c. c. 02 à 0 c. c. 05

de toxine vibrion septique pour hémolysier 0 c. c. 4 de globules de mouton à 5 p. 100, il suffit de 0 c. c. 001 et même de 0 c. c. 0002 de toxine *perfringens* pour produire le même effet.

Résultats obtenus avec le bouillon Wf. — Nous avons comparé l'acidité aminée (déterminée par la méthode de Sörensen) et l'extrait sec de trois bouillons Vf et de trois bouillons Wf. Ces derniers contiennent environ deux fois plus d'azote aminé que les bouillons Vf ; l'extrait sec des trois bouillons Wf examinés a été de 6,63, 7,17, 7,25 p. 100 et celui des bouillons Vf : 4,5, 4,7, 5,15 p. 100.

Le premier des bouillons Wf que nous avonsensemencés (extrait sec 6,63) a permis d'obtenir de la toxine vibrion septique de titre supérieur à celui de la toxine préparée en même temps dans le premier des bouillons Vf indiqués précédemment (extrait sec : 4,5). En effet :

	D. M. par centimètre cube
Titre de la toxine obtenue dans le bouillon Wf	150
Titre de la toxine obtenue dans le bouillon Vf	100
Titre de la toxine obtenue dans le bouillon Wf + 5 p. 1.000 peptone Chapoteaut	200 à 250
Titre de la toxine obtenue dans le bouillon Vf + 5 p. 1.000 peptone Chapoteaut	200

La comparaison des titres des différents échantillons de toxine préparés au cours de cette expérience montre que la peptone Chapoteaut améliore non seulement la valeur nutritive du bouillon Vf mais aussi celle du bouillon Wf.

Dans les deux essais ultérieurs, les bouillons Wf ont été moins favorables à la toxinogénèse que les bouillons Vf.

Exemple : avec le bouillon Vf du 13 novembre 1940 (extrait sec 5,15) nous avons obtenu de la toxine vibrion septique contenant 150 D. M. par centimètre cube et avec le bouillon Wf (extrait sec : 7,25 p. 100) de la toxine à 100 D. M. par centimètre cube.

En résumé, les bouillons préparés avec des tissus de cheval (foie et muscle) permettent d'obtenir des toxines vibrion septique contenant 100 à 300 D. M. par centimètre cube (34).

(34) Nous avons aussi utilisé, pour préparer des toxines histolytiques ou *œdematiens*, des bouillons Vf et Wf de cheval, ainsi que des diges-

B. — Valeur de la « dose-test » de différents échantillons de toxine *Vibron septique* précipitée.

Pour déterminer la « dose-test » des différents échantillons de toxine *vibron septique* que nous avons préparés, c'est-à-dire la quantité de toxine qui, après une heure de contact à 37° avec une unité antitoxique de sérum étalon, tue la moitié environ des souris auxquelles on injecte un tel mélange, nous avons utilisé, comparativement, les sérum étalons internationaux à 20 ou 50 unités antitoxiques par centimètre cube et un sérum étalon français contenant 20 unités (35) par centimètre cube. Nous avons procédé exactement comme pour la détermination des « doses-test » de nos échantillons de toxine *perfringens* (36). Rappelons que dans tous ces titrages nous effectuons les dilutions de toxine et de sérum avec de l'eau physiologique ; nous injectons, pour chaque dose de toxine

tions pepsiques de foie de cheval ; nous avons fréquemment mis en parallèle la valeur nutritive de ces bouillons avant et après adjonction de sang desséché ou de peptones commerciales. [Le sang desséché (1 ou 1,5 p. 1.000), les peptones 5 C et Witte (10 p. 1.000) n'améliorent généralement pas la production de la toxine histolytique dans le bouillon Vf. Voici les titres, exprimés en doses minima mortelles par centimètre cube, de 11 toxines histolytiques obtenues dans des bouillons Vf de cheval : 100 (une fois) ; 150 à 200 (trois fois) ; 200, 250 ou 300 (sept fois).]

Le titre de la toxine *œdematiens* préparée dans la *digestion pepsique de foie* est plus faible que celui des toxines obtenues dans les bouillons Vf de cheval ; la peptone Defresne ou le sang desséché (1,5 p. 1.000) augmentent la valeur nutritive de cette digestion. Dans les bouillons Vf, le *B. œdematiens* élaboré sensiblement la même quantité de toxine que dans les mêmes bouillons additionnés de 1,5 p. 1.000 de sang desséché ou de 5 p. 1.000 de peptone Riedel. Dans le bouillon Vf + sang desséché nous avons effectué 14 préparations et obtenu des toxines contenant, par centimètre cube, 3.000 à 4.000 ou 4.000 et 5.000 doses mortelles (six fois), 6.000, 6.000 à 8.000 ou 8.000 D. M. (six fois), 20.000 et 20.000 à 30.000 D. M. (deux fois). Dans le bouillon Vf + sang desséché nous avons obtenu 6.000 à 8.000 et 10.000 à 12.000 D. M. par centimètre cube (3 essais).

(35) L'unité antitoxique de notre sérum étalon est contenue dans 0 milligr. 1886 du sérum sec 104 provenant d'une saignée faite au cheval 104 le 28 juin 1937.

(36) *Revue d'Immunologie*, 5, 1939, p. 13.

essayée, 4 à 8 souris et le volume injecté à chaque souris, par voie veineuse, est de 0 c. c. 5.

Nous avons déterminé avec le sérum étalon français la « dose-test » de 11 échantillons de toxine vibrion septique : V 1, V 2, ..., V 10, V 11 ; les cinq premiers ont été préparés avec la souche Feunten qui a subi, pendant plusieurs années, deux passages mensuels sur cobayes (voir p. 116) et les six derniers en utilisant, après un seul repiquage, la souche Feunten conservée depuis 1917 dans un tube scellé. Dans le tableau V nous indiquons les résultats de ces dosages, ainsi que les valeurs de la « dose-test » de 7 de ces échantillons, titrés simultanément avec les sérum étalons international et français.

Nous désignons par « dose-test internationale » d'un échan-

TABLEAU V. — Valeurs comparées de la « dose-test » de différents échantillons de toxine vibrion septique titrés avec un sérum étalon danois ou avec un sérum étalon français.

ÉCHANTILLON de toxine	DOSE minima mortelle (milligramme)	VALEUR DE LA « DOSE-TEST » déterminée avec un sérum étalon		NOMBRE de doses mortelles dans une « dose-test française »
		DANOIS (milligrammes)	FRANÇAIS (milligrammes)	
V ₁	0,09	1,9	4,8	20
V ₂	0,08	2,9	3,2	40
V ₃	0,07	2,3	2,5	36,7
V ₄	0,08	3	2,7	33,7
V ₅	0,045	2,4	1,8	40
V ₆	0,07	3,35	3,25	46,4
V ₇	0,08	3,35	3,2	40
V ₈	0,08		4	50
V ₉	0,05		3,4	62
V ₁₀	0,05		2,75	55
V ₁₁	0,095		3,4	32,6

tillon de toxine la valeur de la « dose-test » déterminée au moyen du sérum international et par « dose-test française » la valeur précisée au cours des titrages effectués avec le sérum étalon français.

Des chiffres du tableau V il ressort que les résultats obtenus comparativement avec les deux sérum étalons sont pratiquement concordants. En voici un exemple : la valeur de la

« dose-test » de l'échantillon de toxine vibrion septique V 1 est de 1 milligr. 9 lorsque le titrage est fait avec le sérum étalon danois et de 1 milligr. 8 lorsque le dosage est réalisé avec le sérum étalon français.

Si l'on considère, d'une part, l'extrême variabilité des résultats obtenus avec les sérum étalons anti-*perfringens* international ou français, au cours de la détermination de la « dose-test » des différents échantillons de toxine *perfringens* successivement préparés avec la même souche de *B. perfringens* (37), d'autre part, la similitude des valeurs internationales et françaises de la « dose-test » des 7 échantillons de toxine vibrion septique titrés avec deux sérum étalons, on est autorisé à penser que, contrairement à ce qui se produit lors de l'évaluation de la « dose-test » des toxines *perfringens* (38), la détermination de la « dose-test » des toxines vibrion septique, à 10 p. 100 près, ne présente pas de difficultés. Nous en concluons que nous pouvons utiliser notre sérum étalon pour rechercher la valeur de la « dose-test » des échantillons de toxine vibrion septique que nous préparons.

Nous avons calculé le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test » internationale ou française de nos échantillons de toxine.

Weinberg, Davesne et Prévot (1932), ont noté qu'une unité antitoxique de leur sérum étalon provisoire neutralise approxi-

(37) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *Revue d'Immunologie*, 5, 1939, p. 14 et 18. — GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 66, 1941, p. 204.

(38) Pour ne citer que quelques valeurs des « doses-test » française et anglaise des toxines *perfringens*, rappelons seulement les 4 premières et les 7 dernières déterminations comparatives que nous avons réalisées; les « doses-test » respectives des toxines *perfringens* E 8, E 9, E 10, E 11 sont égales à : 4,2, 2,65, 1,1, 3,4 lorsqu'elles sont déterminées avec le sérum étalon anglais ; 2,8, 3,2, 0,9 et 1 lorsqu'elles sont déterminées avec le sérum étalon français St 1.

Les « doses-test » respectives des 7 toxines E 37, E 38, ..., E 42, E 43, sont de 2,6, 1,9, 2,15, 1,5, 1,9, 2,55, 1,85 lorsqu'elles sont déterminées avec le sérum étalon international et de : 2,6, 1,3, 1,9, 1,5, 2, 1,5, 1,15 lorsqu'elles sont précisées avec le sérum étalon français St 3.

Ainsi la valeur de la « dose-test » de la toxine E 11 trouvée avec le sérum étalon anglais est trois fois plus forte que celle obtenue avec l'étalon français ; la « dose-test » de la toxine E 42 est de 2,55 ou de 1,5 suivant que le sérum étalon utilisé au cours du titrage est un sérum anglais ou un sérum français.

mativement le même nombre de doses mortelles (15 ou 16) des 2 échantillons de toxine qu'ils ont préparés et dont les doses minima mortelles respectives sont de 0 milligr. 29 et 0 milligr. 375 (titrages sur souris, voie veineuse); ces résultats peuvent faire penser qu'une « dose-test » de toxine vibrion septique contient un nombre à peu près constant de doses mortelles (39).

Des observations faites ultérieurement par Ida Bengston (1934) se dégagent au contraire la notion qu'une « dose-test » de toxine ne représente pas toujours un nombre fixe de doses mortelles : un quart d'unité antitoxique de son sérum étalon neutralise, en effet, 10, 12, 15,6 ou 16 doses mortelles de différentes toxines vibrion septique obtenues soit en Angleterre, soit en Amérique (40).

Voici les renseignements que fournissent les résultats du titrage de tous nos échantillons de toxine, préparés avec la même souche de vibrion septique :

Une « dose-test française » de l'échantillon V1 contient 20 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V2 contient 40 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V3 contient 36,7 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V4 contient 33,7 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V5 contient 40 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V6 contient 46,4 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V7 contient 40 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V8 contient 50 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V9 contient 62 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V10 contient 55 D.M.
 Une « dose-test française » de l'échantillon V11 contient 32,6 D.M.

Ces 11 déterminations montrent qu'une unité antitoxique du sérum étalon français neutralise 40 doses mortelles de 3 échantillons de toxine (V 2, V 5, V 7) et 20 à 62 doses mortelles des autres échantillons. De ces chiffres, il ressort nettement qu'une « dose-test » de toxine vibrion septique représente fréquemment un nombre variable de doses mortelles.

(39) WEINBERG (M.), DAVESNE (J.) et PRÉVOT (A.-R.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 387.

(40) BENGSTON (Ida). *Public Health Report*, **49**, 1934, p. 261.

III. — TITRAGE DES SÉRUMS ANTI-VIBRION SEPTIQUE

COMPARAISON DES TITRES OBTENUS AVEC DIVERS ÉCHANTILLONS
DE TOXINE HOMOLOGUE.

Rappelons que, pour Sordelli, Ferrari et Mayer (1929), la détermination du titre antitoxique des sérum anti-vibron septique par la méthode des injections intraveineuses ou intramusculaires au cobaye fournit des résultats plus réguliers que celle des injections intraveineuses à la souris.

Après que Tzeknovitzer et Karouth (1930) eurent proposé la technique des injections intradermiques au cobaye, Glenny, Llewellyn-Jones et Mason (1931) signalèrent que cette méthode donne approximativement les mêmes résultats que le procédé des injections intraveineuses à la souris.

Weinberg, puis Schlingmann (1934) ont effectué des injections intraveineuses au lapin et Weinberg a considéré comme propre à l'usage thérapeutique tout sérum qui, à la dose de 1/1.000 de centimètre cube, protège les lapins de 2 kilogrammes contre une dose mortelle de toxine ; Weinberg, Davesne et Prévot (1932) ont comparé les résultats des titrages réalisés sur lapins et souris (41). Ils ont établi que les sérum anti-vibron septique qui protègent le lapin à la dose de 1/1.000 de centimètre cube correspondent à peu près à 250 unités-souris (injections intraveineuses).

Ida Bengston (1933), au cours de ses déterminations de la « dose-test » de différents échantillons de toxine vibron septique au moyen d'un sérum étalon provisoire, n'a pas obtenu de résultats satisfaisants par le procédé des injections intramusculaires au cobaye et, de la comparaison des titrages sur lapin et souris, a conclu que les meilleurs résultats sont obtenus sur souris : dans ce dernier cas, elle a observé des différences de 10 p. 100.

(41) WEINBERG (M.), DAVESNE (J.) et PRÉVOT (A.-R.) ont observé au cours de ces recherches qu'une dose mortelle de toxine pour le lapin représente 15 à 16 doses mortelles pour la souris. Ces *Annales* 49, 1932, p. 407.

Au cours de tous ces titrages, les différents auteurs mentionnés ont employé comme dose d'épreuve de toxine, des quantités inégales de toxine. Sordelli, Ferrari et Mayer ont utilisé un peu plus de 5 doses mortelles pour le cobaye ; Glenny, Llewelly-Jones et Mason, 20 doses mortelles pour la souris ; Schlingmann, 10 doses mortelles pour le lapin ; Weinberg, Davesne et Prévot, 1 dose mortelle pour le lapin ou 15 à 16 doses mortelles pour la souris.

Les différents auteurs ayant ainsi adopté comme dose d'épreuve de toxine et, par là même, comme unité antitoxique, des valeurs arbitraires distinctes, les pouvoirs antitoxiques des sérum anti-vibron septique titrés dans divers pays ne pouvaient être aisément comparés.

Depuis que la valeur de l'unité antitoxique internationale d'un sérum étalon anti-vibron septique et le mode de détermination de la « dose-test » d'un échantillon de toxine homologue ont été définis par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations (42) des résultats concordants ont été obtenus au cours du titrage d'un même sérum anti-vibron septique avec une « dose-test » de 4 échantillons de toxine (43) ; un nombre plus élevé d'échantillons n'a pas été utilisé comparativement pour titrer simultanément plusieurs sérum anti-vibron septique. Sachant que la détermination du titre antitoxique des sérum anti-*perfringens* vis-à-vis d'un nombre suffisant d'échantillons de toxine homologue permet d'observer de grandes discordances entre les résultats des dosages (44), il y avait lieu de penser que la question du titrage des sérum anti-vibron septique était insuffisamment étudiée. Pour

(42) Rapport de HARTLEY (P.) et BRUCE WHITE (P.). *Bull. Trim. Org. d'Hyg. de la Soc. des Nations*, 4, 1935, p. 13-41.

(43) Ce sérum a été titré avec les toxines V S 10 et V S 11 dans les laboratoires de MM. COY et WEINBERG ; avec les toxines V S 1 et V S 10 dans le laboratoire de M. COY et avec les toxines E et V S 10 dans celui de M. O'BRIEN.

(44) Par exemple, le sérum anti-*perfringens* 415 titre 400 unités d'après les déterminations effectuées avec une « dose-test internationale » des toxines E 13, E 18, E 32 ; il titre : 800 unités lorsque le titrage est réalisé avec une « dose-test internationale » de la toxine E 15 ; 250 à 300 unités lorsque le titrage est réalisé avec une « dose-test internationale » de la toxine E 42 ; 50 unités lorsque le titrage est réalisé avec une « dose-test internationale » de la toxine E 24.

combler cette lacune, nous avons recherché vis-à-vis de 7 échantillons de toxine vibron septique le titre antitoxique de 4 sérums correspondants. Nous avons eu recours à la méthode des injections intraveineuses à la souris : les chiffres de S. Stewart et ceux que nous avons obtenus au cours de nombreuses déterminations montrent qu'on peut attendre de cette méthode des résultats à 10 p. 100 près, erreur tolérée dans les expériences sur souris de 17 à 20 grammes. Dans quelques titrages, nous avons employé, comparativement, comme dose d'épreuve de chaque échantillon de toxine, soit « une unité » de toxine (c'est-à-dire 20 D. M. M. de cette toxine), soit une « dose-test » ; dans tous les autres, nous avons uniquement utilisé une « dose-test » de chaque échantillon de toxine. Nous avons pris comme valeur de la « dose-test » le chiffre déterminé avec le sérum étalon international.

a) TITRAGES AVEC UNE « UNITÉ » DE TOXINE. — Pour réaliser ces dosages, nous avons suivi les mêmes principes que ceux que nous avons indiqués dans le tableau VI, p. 20 de notre travail sur le titrage des sérums anti-*perfringens* (*Rev. d'Immunol.*, 5, 1939, p. 5 à 33). Par dose de sérum essayée nous avons injecté au moins 4 souris de 17 à 20 grammes.

Les déterminations ainsi effectuées nous ont montré (45) que le titre antitoxique d'un même sérum varie généralement beaucoup avec l'échantillon de toxine. En voici un exemple :

Le sérum Fj 1 titre entre 400 et 450 unités lorsque le dosage est fait avec une « unité » de toxine V 1, 850 unités lorsque la toxine employée est la toxine V 2 ; 850 à 900 unités vis-à-vis de la toxine V 3 et 650 unités vis-à-vis de V 4. Ainsi le titre de ce sérum varie entre 400 à 450 unités et 850 à 900 unités suivant l'échantillon de toxine utilisé pour effectuer le titrage, la quantité de toxine employée au cours de ces déterminations étant de 20 doses mortelles par souris.

Nous n'insisterons pas davantage sur les résultats discordants observés au cours des titrages effectués avec « une unité » de toxine. Avec raison, cette méthode est totalement

(45) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 127, 1938, p. 1084.

abandonnée à présent. Il convenait toutefois de la mentionner pour opposer ses résultats à ceux que l'on obtient lorsque les titrages sont réalisés en prenant comme dose d'épreuve de toxine une « dose-test » des mêmes échantillons de toxine.

b) **TITRAGES AVEC UNE « DOSE-TEST » DE TOXINE.** — Nous groupons dans le tableau VI l'ensemble des chiffres que nous avons obtenus en recherchant vis-à-vis d'une « dose-test » de

TABLEAU VI. — **Valeurs antitoxiques de 4 sérums anti-vibron septique titrés avec une « dose-test » de différents échantillons de toxine vibron septique.**

ÉCHANTILLON de toxine ("dose-test internationale" en milligrammes)	SÉRUM Fj ₄ (unités)	SÉRUM 104 (unités)	SÉRUM 327 (unités)	SÉRUM 341 (unités)
V ₁ (1,9)	400-450	500	400	400
V ₂ (2,9)	450	500-550	400-450	450-500
V ₃ (2,3)	425	500-550	400-450	450
V ₄ (3)	350-400	400-450	450-500	350
V ₅ (2,1)	400-450	500	450-500	400-450
V ₆ (3,35)	350-400	400-450	400	400
V ₇ (3,35)	350-400	400-450	400	400

7 échantillons de toxine le titre antitoxique de 4 sérums anti-vibron septique.

Nous avons injecté 4 à 8 souris de 17 à 20 grammes par dose de sérum éprouvé.

L'examen rapide du tableau VI montre que les titres antitoxiques du sérum 327 vis-à-vis des 7 échantillons de toxine étudiés sont, dans l'ensemble, plus homogènes que ceux des autres sérums : ils diffèrent entre eux de 15 p. 100 au plus. Ce sérum titre en effet : 400 unités antitoxiques lorsque le titrage est fait avec les toxines V 1, V 6 ou V 7 ; 400 à 450 unités lorsqu'il est réalisé avec les toxines V 2 ou V 3 ; 450 à 500 unités anti-V 4 ou anti-V 5. Les titres antitoxiques des trois autres sérums sont plus faibles vis-à-vis des toxines V 4, V 6 et V 7 que vis-à-vis des toxines V 1, V 2, V 3 et V 5. Le sérum Fj 4, par exemple, titre plus de 400 unités lorsqu'il est éprouvé vis-à-vis des toxines V 1, V 2, V 3 et V 5 et moins

de 400 unités lorsqu'il est mélangé avec une « dose-test » de l'une des 3 autres toxines. Le sérum 104 titre plus de 450 unités d'après les titrages réalisés avec les toxines V 1, V 2, V 3, V 5, et moins de 450 unités vis-à-vis des toxines V 4, V 6, V 7.

Si nous considérons de plus près les résultats des titrages des sérum Fj 1, 104 et 341, nous voyons que :

1° Les dosages effectués avec les toxines V 1, V 2, V 3, V 5 aboutissent à des résultats pratiquement concordants. Ainsi, le sérum Fj 1 titre 450 unités anti-V 2, 425 unités anti-V 3, 400 à 450 unités anti-V 1 ou anti-V 5 ;

Le sérum 104 titre 500 unités anti-V 1 et anti-V 5, 500 à 550 unités anti-V 2 et anti-V 3.

2° Les échantillons de toxine V 6 et V 7, préparés avec la souche de vibrion septique qui n'a pas subi de repiquages de 1917 à 1939, permettent d'obtenir les mêmes résultats que l'échantillon V 4 préparé après de nombreux passages de cette souche sur cobayes.

En effet, le sérum Fj 1 titre entre 330 et 400 unités, que le dosage soit fait avec une « dose-test » des échantillons V 4, V 6 ou V 7 ; le sérum 104 titre 400 à 450 unités vis-à-vis de l'une quelconque de ces toxines ; le sérum 341 titre 350 unités anti-V 4, 400 unités anti-V 6 et anti-V 7.

3° Les chiffres obtenus au cours des titrages réalisés avec les toxines V 1, V 2, V 3, V 5, sont supérieurs de 16 à 26 p. 100 à ceux que fournissent les titrages pratiqués avec les toxines V 4, V 6 ou V 7.

Les écarts les plus grands que nous avons notés sont en effet les suivants :

Le sérum Fj 1 titre 450 unités anti-V 2, 350 à 400 unités anti-V 4, anti-V 6 ou anti-V 7 ;

Le sérum 104 titre 500 à 550 unités anti-V 2 ou anti-V 3, 400 à 450 unités anti-V 4, anti-V 6 ou anti-V 7 ;

Le sérum 341 titre 450 à 500 unités anti-V 2, 350 unités anti-V 4.

Ainsi, en utilisant 7 échantillons de toxine pour rechercher le titre antitoxique de 4 sérum anti-vibrion septique, nous avons enregistré une concordance satisfaisante entre les résultats du titrage d'un sérum vis-à-vis des 7 échantillons de

toxine ; nous avons constaté, par contre, que les résultats du titrage des trois autres sérums divisent nos échantillons de toxine en deux groupes : le groupe des toxines V 1, V 2, V 3, V 5, et le groupe des toxines V 4, V 6 et V 7. Les résultats concordants obtenus avec les 4 échantillons du premier groupe présentent avec les résultats homogènes obtenus avec les 3 échantillons du deuxième groupe des écarts de 16 à 26 p. 100. On peut en inférer qu'il existe des différences de constitution antigénique entre les deux groupes de toxine.

De l'ensemble de ces déterminations, effectuées par la méthode des injections intraveineuses à la souris, nous conclurons que l'évaluation du titre antitoxique des sérums anti-vibrion septique vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine homologue ne fournit pas toujours des résultats parfaitement concordants ; il peut en effet exister, entre les valeurs antitoxiques trouvées pour un même sérum, des différences de 15, 20 et 25 p. 100.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Préparation de la toxine Vibrion septique.

1^o TITRE ET PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE VIBRION SEPTIQUE PRÉPARÉE DANS LE BOUILLON Vf ORDINAIRE (DIGESTION CHLORHYDRO-PEPSIQUE DE VIANDE ET DE BOEUF).

a) La toxine vibrion septique préparée à 37°, dans du bouillon Vf de bœuf glucosé à 5 p. 1.000, contient généralement 150 à 350 doses mortelles par centimètre cube (titrages vingt-deux heures après l'ensemencement, par la méthode des injections intraveineuses à des souris de 17 à 20 grammes).

Le pH de la toxine centrifugée est fréquemment égal à 5,4 et 5,6 (tableau III).

b) La dose minima mortelle moyenne de nos échantillons de *toxine vibrion septique précipitée par le sulfate d'ammonium* est de 0 milligr. 07 ; chiffres extrêmes : 0 milligr. 05 et 0 milligr. 095 (tableau V).

La quantité moyenne de toxine précipitée par litre de toxine centrifugée est de 6 gr. 930, 11 gr. 980 ou 9 gr. 630, suivant que les cultures sont effectuées dans du bouillon glucosé à 2, 5 ou 10 p. 1.000. D'après ces chiffres, la concentration optimale du glucose est de 5 p. 1.000.

Le sulfate d'ammonium précipite, en moyenne, 64,8 p. 100 de la toxine présente dans le liquide soumis à la précipitation (chiffres extrêmes : 45 et 94 p. 100).

c) L'élaboration de la toxine vibrion septique est rapide à 37°. Dans les bouillons Vf glucosés à 5 p. 1.000 et dont le pH avant l'ensemencement est compris entre 7,55 et 7,65, le titre de la toxine centrifugée peut atteindre le taux de 300 doses mortelles par centimètre cube seize heures après l'ensemencement. Dans des bouillons Vf moins nutritifs, le maximum de toxicité ne se produit que vingt à vingt-deux heures après l'ensemencement.

d) La toxicité des cultures de vibrion septique maintenues à 37° diminue de 25 p. 100 au plus pendant les dix-huit à vingt heures qui suivent le moment où elles ont atteint leur titre maximum. La toxine vibrion septique ne s'atténue donc que lentement à 37°.

A 2°, le titre de la toxine liquide reste stable pendant au moins cinq semaines ; à 100°, la toxicité et l'activité hémolytique sont supprimées.

A l'état sec, la toxine vibrion septique précipitée conserve son titre pendant plusieurs années.

e) Le pouvoir antigène de la toxine vibrion septique liquide est intense : injectée à doses croissantes, tous les sept jours, à des chevaux ayant préalablement reçu 3 vaccinations d'antitoxine vibrion septique, elle permet fréquemment d'obtenir, en six à huit semaines, des sérum contenant 300 à 600 unités antitoxiques par centimètre cube. Les injections ultérieures accentuent généralement l'immunisation : la teneur des sérum en antitoxine peut atteindre les taux de 800 et 1.000 unités par centimètre cube et quelquefois 1.200 et même 1.500 à 1.800 unités internationales.

La toxine vibrion septique précipitée par le sulfate d'ammonium et enrobée dans la lanoline détermine aussi l'hyperimmunisation rapide des chevaux.

**2° TOXINOGENÈSE DANS LE BOUILLON Vf ORDINAIRE
ADDITIONNÉ DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES.**

a) Le phosphate bipotassique et le pyruvate de soude ajoutés aseptiquement au bouillon Vf glucosé augmentent, dans 10 cas sur 17, la production de la toxine vibrion septique.

Le titre maximum des toxines que nous avons obtenues dans les bouillons additionnés, par litre, de 5 ou 8 grammes de phosphate bipotassique et de 2 grammes de pyruvate de soude, a été de 400 doses mortelles par centimètre cube ; leur pH a varié entre 5,9 et 6,8.

b) L'acide ascorbique, aux doses de 0 gr. 15 et de 0 gr. 25 par litre de bouillon Vf, ne favorise pas la formation de la toxine vibrion septique.

c) Le sang desséché de cheval n'améliore généralement pas la toxinogenèse dans les bouillons Vf ordinaires glucosés à 5 p. 1.000.

3° TOXINOGENÈSE DANS DIVERS BOUILLONS.

Le sang desséché, la peptone Defresne ou l'extrait de viande augmentent la production de la toxine vibrion septique dans les digestions pepsiques de foie de cheval.

Les bouillons préparés avec six parties de viande de cheval pour une partie de foie n'ont pas toujours une valeur nutritive supérieure à celle des bouillons préparés avec trois parties de viande de cheval et une partie de foie.

L'addition de 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut aux bouillons préparés avec des muscles et du foie de cheval accroît généralement la toxinogenèse ; la toxine vibrion septique obtenue dans ces bouillons contient, par centimètre cube, 100 à 250 doses mortelles et 20 à 50 doses hémolytiques.

« Dose-test » de la toxine Vibrion septique.

En recherchant la valeur de la « dose-test » de 7 échantillons de toxine, nous avons constaté que les *titrages effectués comparativement avec le sérum étalon international et le sérum*

é^talon fran^çais fournissent tous des r^ésultats d'une concorde satisfaisante (tableau V).

Nous pouvons donc utiliser notre s^érum *é*tal^{on} pour *é*valuer la « dose-test » des *é*chantillons de toxine que nous *pré*parons.

Le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test » de nos divers *é*chantillons de toxine *vibrion septique* est compris entre 20 et 62 ; les r^ésultats de 11 titrages indiquent qu'une « dose-test » de toxine contient le plus souvent 32 \pm 43 doses mortelles pour la souris (injections intraveineuses).

Titrage des s^érum^s anti-*Vibrion septique*.

Nous avons d^étermin^é, vis-*à*-vis d'une « dose-test » de 7 *é*chantillons de toxine *pré*par^és avec la m^{ême} souche de *vibrion septique*, le titre antitoxique de 4 s^érum^s anti-*vibrion septique*. Comme valeur de la « dose-test » nous avons pris celle que nous avons *pré*cis^ée avec le s^érum *é*tal^{on} danois. Nous avons constat^é que les titres antitoxiques d'un m^{ême} s^érum vis-*à*-vis des 7 toxines examin^ées diff^érent au plus de 10 p. 100 dans la majorit^é des cas, mais pr^ésentent parfois des *é*carts de 16 \pm 25 p. 100.

ERRATUM

Dans notre précédent m^émoire, ces *Annales*, 66, mai 1941, page 373, dixi^{ème} ligne de la note en bas de page, lire 12 grammes de pepsine en poudre, *au lieu* de 15 grammes.

RECHERCHES SUR LA RÉPARTITION DU BORE DANS LES ESPÈCES VÉGÉTALES (1)

par GABRIEL BERTRAND et LAZARE SILBERSTEIN.

En cherchant si des espèces végétales possèdent des besoins différents à l'égard du bore, l'un de nous a trouvé, en collaboration avec H. de Waal (2) et avec L. Silberstein (3) qu'il semble exister une relation entre la capacité de fixation du métalloïde et la place des espèces dans l'échelle botanique. Il était apparu, notamment, que les Graminées (5 espèces étudiées) et les Liliacées (3 espèces), de l'embranchement des Monocotylédones, renferment notamment moins de bore que les plantes de l'embranchement des Dicotylédones. En outre, parmi ces dernières, la plupart des Légumineuses ou, plus précisément, des Papilionacées (11 espèces) et des Crucifères (5 espèces) s'étaient montrées parmi les plus aptes à fixer l'oligoélément considéré dans leurs tissus.

Ces différences, observées en étudiant des plantes cultivées sur le même sol, offrant non seulement un intérêt physiologique mais aussi un intérêt pratique, nous avons pensé qu'il était utile d'en chercher la confirmation par l'examen d'un plus grand nombre d'espèces végétales.

Nous avons analysé, cette fois, non seulement des plantes cultivées ou développées spontanément sur un même sol, dans le jardin de l'Institut Pasteur, à Paris, plantes qui peuvent être, par suite, rapprochées étroitement de celles qui ont fait l'objet des publications citées plus haut, mais aussi de plantes récoltées dans des habitats naturels très différents : en Seine-et-Oise (forêt de Marly), en Savoie (environs de Thonon, cirque du Fer-à-Cheval, près de Sixt, vallée de l'Arve, près

(1) Un extrait de ce mémoire a paru dans les *C. R. Ac. Sc.*, **211**, séance du 16 décembre 1940, p. 624.

(2) Ces *Annales*, **57**, 1936, p. 121.

(3) Ces *Annales*, **59**, 1937, p. 442 ; **61**, 1938, p. 104 ; **64**, 1940, p. 456.

de Chamonix), en Vendée (Brétignolles, Saint-Vincent-sur-Jars), en Haute-Garonne (lac d'Oô, environs de Luchon), en Hautes-Pyrénées (Gavarnie) et dans les Landes (bords de l'Adour, à Aire). Les espèces suivantes ont été étudiées :

TABLEAU I.

FAMILLES	NOMS DES PLANTES	LIEUX DE RÉCOLTE
<i>Monocotylédones.</i>		
Graminées	Lyraie (<i>Lolium perenne</i> L.).	Institut Pasteur (sp.).
"	Chiendent (<i>Cynodon dactylon</i> Pers.).	Thonon.
Cypéracées	Carex (sp.?).	Marly.
Aroidées	Pied-de-véau (<i>Arum maculatum</i> L.).	Marly.
Iridées	Iris germanique (<i>Iris germanica</i> L.).	Institut Pasteur (cult.).
Orchidées	(<i>Listera ovata</i> R. Br.).	Marly.
Asparaginées	Muguet (<i>Convallaria majalis</i> L.).	Marly.
"	Sceau-de-Salomon (<i>Polygonatum vulgaris</i> Desf.).	Marly.
Liliacées	Parisette (<i>Paris quadrifolia</i> L.).	Marly.
	Jacinthe des bois (<i>Agraphis nutans</i> Link.).	Marly.
<i>Dicotylédones.</i>		
Euphorbiacées . . .	Mercuriale (<i>Mercurialis annua</i> L.).	Institut Pasteur (sp.).
"	Euphorbe des bois (<i>Euphorbia sylvatica</i> L.).	Marly.
"	Euphorbe marine (<i>Euphorbia paralias</i> L.).	Vendée.
Polygonées	Bistorte (<i>Polygonum bistorta</i> L.).	Institut Pasteur (cult.).
Verbenacées	Verveine (<i>Verbena officinalis</i> L.).	Thonon.
Labiacées	(<i>Lamium amplexicaule</i> L.).	Institut Pasteur (sp.).
"	Ortie blanche (<i>Lamium album</i> L.).	Marly.
"	Ortie jaune (<i>Lamium galeopodolon</i> Crantz).	Marly.
"	Lierre terrestre (<i>Glecoma hederacea</i> L.).	Marly.
"	Mélisse des bois (<i>Melittis officinalis</i> L.).	Marly.
"	Menthe aquatique (<i>Mentha aquatica</i> L.).	Aire-sur-Adour.
"	Bugle (<i>Ajuga reptans</i> L.).	Marly.
"	Origan (<i>Origanum vulgare</i> L.).	Thonon.
Scrofulariacées . . .	Euphrasie (<i>Euphrasia officinalis</i> L.).	Vallée-de-l'Arve.
Verbacées	Molène noir (<i>Verbascum nigrum</i> L.).	Luchon.
Composées	Chardon (sp.?).	Institut Pasteur (sp.).
"	Pissenlit (<i>Taraxacum officinale</i> Vill.).	Marly.
"	Armoise (<i>Artemisia vulgaris</i> L.).	Thonon.
"	Souci (<i>Calendula arvensis</i> L.).	Thonon.
"	(<i>Helichrysum staechas</i> D. C.).	Brétignolles.
"	Pulicaire (<i>Pulicaria vulgaris</i> Gaertner).	Aire-sur-Adour.
"	Pâquerette (<i>Bellis perennis</i> L.).	Marly.
Dipsacées	Scabieuse des champs (<i>Scabiosa arvensis</i> L.).	Sixt (Fer-à-cheval).
Caprifoliacées . . .	Merisier des haies (<i>Lonicera xylosteum</i> L.).	Marly.
Pomacées	Aubépine (<i>Crataegus oxyacantha</i> L.).	Marly.
Rosacées	Fraiser des bois (<i>Fragaria vesca</i> L.).	Marly.
"	Quintefeuille (<i>Potentilla reptans</i> L.).	Marly.
Papilionacées . . .	Lupin bleu (<i>Lupinus hirsutus</i>).	Institut Pasteur (cult.).

FAMILLES	NOMS DES PLANTES	LIEUX DE RÉCOLTE
Papilionacées . . .	Lupin jaune (<i>Lupinus luteus</i> L.).	Institut Pasteur (cult.).
" . . .	Luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.).	Saint-Vincent-sur-Jars.
Malvacées . . .	Rose trémière (<i>Althea rosea</i> Cav.).	Institut Pasteur (cult.).
Caryophyllées . . .	Œillet gaulois (<i>Dianthus gallicus</i> Pers.).	Brétignolles.
" . . .	Saponaire (<i>Saponaria officinalis</i> L.).	Thonon.
" . . .	Compagnon blanc (<i>Lychnis dioica</i> L.).	Marly.
Droséracées . . .	Parnassie (<i>Parnassia palustris</i> L.).	Lac d'Oô.
Résédacées . . .	Réséda sauvage (<i>Reseda lutea</i> L.).	Thonon.
Violariées . . .	Violette du chien (<i>Viola canina</i> L.).	Marly.
Crucifères . . .	Bourse à pasteur (<i>Thlaspi bursa-pastoris</i> L.).	Institut Pasteur (sp.).
Crucifères . . .	(<i>Iberis umbellata</i> L.).	Institut Pasteur (cult.).
" . . .	Giroflée (<i>Cheiranthus chaire</i> L.).	Institut Pasteur (cult.).
" . . .	Coquillier (<i>Cakile maritima</i> D. C.).	Brétignolles.
" . . .	(<i>Mathiola sinuata</i> R. Br.).	Brétignolles.
Palavéracées . . .	Chélidoine (<i>Chelidonium majus</i> L.).	Institut Pasteur (sp.).
Renonculacées . . .	Aconit (<i>Aconitum napellus</i> L.).	Gâvarnie.
" . . .	Renoncule acrée (<i>Ranunculus acris</i> L.).	Marly.
" . . .	Renoncule bulbeuse (<i>Ranunculus bulbosus</i> L.).	Marly.

La cueillette a toujours été effectuée au moment de la floraison. Après lavage et dessiccation à la température ordinaire, les plantes ont été pulvérisées et analysées selon la technique microcolorimétrique utilisée dans les recherches antérieures. Les prises d'essai ont été, après dessiccation à + 100-110°, comprises entre 0 gr. 7 et 0 gr. 9, sauf pour le Cakile, la Bistorte, la Pâquerette et le Sceau-de-Salomon où, faute de matière, elles ont été réduites entre 0 gr. 3 et 0 gr. 5.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous d'abord pour les Monocotylédones, puis pour les Dicotylédones, et rangés, dans les deux séries, par ordre de teneur croissante en bore des matières sèches. En outre, pour faciliter encore les comparaisons, les noms des plantes des familles des Graminées, des Papilionacées et des Crucifères sont précédés des lettres (G), (P) et (C).

Ces nouveaux résultats portent à 120 le nombre des espèces examinées au laboratoire par la même méthode. Ils sont très significatifs en ce qui concerne la relation, aperçue en 1936, entre la capacité de fixation du bore par les espèces végétales et la position de celles-ci dans la classification naturelle.

Sans qu'il existe une ligne de démarcation absolue entre l'embranchement des Monocotylédones et celui des Dicotylédones, il apparaît que les espèces du premier renferment, en général, une proportion de bore moindre que celles du second.

TABLEAU II.

NOMS DES ESPÈCES	MATIÈRES sèches p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	BORE en milligrammes par kilogramme	
			de matière fraîche	de matière sèche
<i>Monocotylédones :</i>				
(G) Ivraie	29	11,5	0,8	2,9
(G) Chiendent		6,4		3,8
Iris germ.	9,23	10,3	0,5	5,1
Carex	28,1	12,9	1,5	5,4
Parisette	16,6	9,6	1,4	8,7
Pied de veau	10,6	13,2	1	9,3
<i>Listera ov.</i>	8,8	13,2	0,9	9,9
Muguet	19	10,3	2,1	11,2
Jacinthe des bois	12,2	7,9	1,4	11,2
Sceau de Salomon	14,1	10,5	1,6	11,4
<i>Dicotylédones :</i>				
Chardon	17,8	15,8	1,4	8
Aconit		9,3		8,1
<i>Lonicera xylo.</i>	33,5	8,6	2,9	8,8
Lierre terrestre	20,2	11,8	1,8	9,1
Menthe aq.		11,8		9,1
Aubépine	35,6	7,4	3,3	9,2
Pied de veau	10,6	13,2	1	9,3
Renoncule âcre	17,5	13,6	1,6	9,4
(C) <i>Iberis umbellata.</i>	17,4	16,3	1,6	9,4
Euphorbe des beis	26,7	6,8	2,6	9,6
Fraisier des bois	35	10,1	3,4	9,8
OEillet gaulois		9,4		10
Bistorte	18	9,6	1,8	10,1
Euphrasie		9,5		10,1
<i>Lamium ampl.</i>	13,3	16,3	1,4	10,2
Parnassie		9		10,6
Mélisse des bois.	16,6	12,5	1,8	10,9
Scabieuse		10,6		10,9
(C) Bourse à pasteur	15,7	14	1,7	11
Pâquerette	23,1	14,6	2,6	11,4
Verveine		13,6		12
Renoncule bulbeuse	24,2	13,3	2,9	12
Violette de chien	25,8	12,5	3,1	12,2
Ortie blanche	17,5	14,8	2,2	12,3
Armoise		10,9		12,7
Mercuriale ann.	14	18,8	1,8	12,5
Mercuriale ann.	13,2	19,5	1,7	13
Ortie jaune	20,4	13,7	2,7	13,2
(C) Giroflee	20	21	2,7	13,3
Quintefeuille	35,4	8,4	4,8	13,7
Rose trémière	24,2	10,4	3,4	13,9
Réséda sauvage		16		13,9
Pissenlit	13,9	12,7	2	14,1
Origan		6,8		14,2
Compagnon blanc	14,3	14,9	2,1	14,4
Souci		17,7		14,7
Pulicaire		13,7		14,9

NOMS DES ESPÈCES	MATIÈRES sèches p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	BORE en milligrammes par kilogramme	
			de matière fraîche	de matière sèche
Molène noir		8,7		15,1
Euphorbe marine		10		16
Bugle	16	12,5	2,6	16,4
(P) Lupin bleu	42,5	10,4	2,1	16,9
Chélidoine	16,3	13,6	2,8	17
<i>Helichrysum st.</i>		12,3		17,2
(P) Lupin jaune	11,2	10,2	2	17,9
Saponaire		11		17,9
(C) Matthiola		29,6		20,5
(C) Cakile		28,6		22,3
(P) Luzerne		9,8		28,7

Il n'y en a été trouvé, en effet, par kilogramme de matières sèches, que 2 milligr. 3 à 11 milligr. 4 contre 8 à 95 milligrammes.

En outre, chez les Monocotylédones, la grande famille des Graminées s'est montrée nettement la plus pauvre, avec 2 milligr. 3 à 5 milligrammes seulement de métalloïde par kilogramme sec.

Parmi les Dicotylédones, beaucoup plus nombreuses en familles et en espèces, il n'est pas possible de tirer des 86 analyses effectuées des règles aussi formelles. Il reste toutefois à retenir que les importantes familles des Papilionacées et des Crucifères comprennent relativement beaucoup d'espèces parmi les plus riches en bore.

Le chevauchement entre la fin de la série des Monocotylédones et le commencement de la série des Dicotylédones tient évidemment à ce qu'il existe des espèces de Dicotylédones qui ne présentent pour le bore que des affinités réduites, de l'ordre de grandeur de celles de certaines Monocotylédones. C'est ainsi que l'*Iberis umbellata* et la Bourse-à-Pasteur, bien qu'appartenant à la famille ordinairement riche des Crucifères, ne contiennent que des proportions du métalloïde analogues à celles rencontrées dans le Pied-de-veau et dans le Muguet-des-bois.

Il est certain, par ailleurs, et cette observation s'applique

à l'ensemble des végétaux, que si des espèces peuvent maintenir assez étroitement leur composition chimique à travers les conditions culturables auxquelles elles se trouvent soumises malgré la diversité des sols et les circonstances atmosphériques, d'autres offrent au contraire, à cet égard, une importante plasticité. En confrontant les résultats analytiques dont nous disposons actuellement, nous trouvons, par exemple, les quantités suivantes de bore, exprimées en milligrammes par kilogramme de matières sèches :

	BORE
Luzerne, cultivée en 1937, dans le jardin de l'Institut Pasteur, par la méthode colorim.	25
Luzerne, cultivée en 1937, dans le jardin de l'Institut Pasteur, par la méthode volum.	28,9
Luzerne, récoltée en 1939, dans les dunes de Saint-Vincent- sur-Jars, par la méthode colorim	28,7

et, par contre :

Pissenlit, cultivé en 1936, dans le jardin de l'Institut Pasteur, par la méthode colorim.	80
Pissenlit, récolté en 1939, dans la forêt de Marly, par la méthode colorim.	14,1

Ces différences ne peuvent que tendre à masquer le mode essentiel de répartition du métalloïde chez les espèces végétales, à faire varier plus ou moins en conséquence, le chevauchement des groupes les uns sur les autres, selon les récoltes. Les cas où triomphent les causes des affinités spécifiques à l'égard du bore n'en offrent que plus d'intérêt.

Après les premières constatations rappelées au début de cet exposé, Marie P. Löhnis (4) a publié, dans un mémoire sur *le développement des plantes en l'absence de bore*, une série de déterminations de la teneur en bore d'après la même méthode que la nôtre, portant sur 4 espèces de Graminées et 14 espèces de Dicotylédones, principalement Papilionacées et Crucifères. Chez les Graminées, la teneur a été trouvée de 0 milligr. 7 à 3 milligr. 3 par kilogramme de matières sèches, alors qu'elle variait de 3 milligr. 3 à 33 milligrammes chez les Papilionacées et de 16 milligr. 7 à 33 milligrammes chez les

(4) *Mededeelingen van de Landbouwhoogeschool*, 41, III, 1937, p. 1-38.

Crucifères. Ces déterminations sont en complet accord avec celles auxquelles nous sommes nous-mêmes arrivés.

On peut donc considérer désormais comme démontrée l'existence de certaines relations entre le mode de répartition quantitative du bore dans les espèces végétales et la place de celles-ci dans la classification naturelle. La plus remarquable de ces relations, à cause de sa netteté, celle qui met en tête de liste des Phanérogames, à partir des moins riches en bore, les plantes de la famille des Graminées, est aussi de réelle importance au point de vue agricole, car elle distingue, sous le rapport des besoins en substances fertilisantes, les Céréales de l'ensemble des autres plantes de grande culture.

En 1912, lors d'une conférence faite à la séance d'ouverture du VIII^e Congrès international de Chimie appliquée, tenu à New-York (5), l'un de nous a présenté la thèse de l'intervention de divers métaux et métalloïdes, présents dans les plantes en très petites proportions, dans la pratique multiséculaire des rotations culturales. Les résultats de l'étude phytobiologique du bore contenus dans le présent mémoire confirment et précisent utilement cette thèse. Joints à la notion de l'optimum de concentration nutritive (6), les mêmes résultats serviront de guide à l'agriculture dans le dosage des engrains boratés pour obtenir avec chaque plante l'effet le plus avantageux.

(5) *C. R. VIII^e Congr. Chim. appl.*, New-York, **28**, 1912, p. 30 et reproduite dans diverses publications, notamment dans ces *Annales*, **26**, 1912, p. 852.

(6) Voir : BERTRAND (Gabriel). Les engrais autres que les engrais azotés, phosphorés et potassiques. *Chim. et Ind.*, **41**, n° 3 bis, 1939, p. 27 E.

Le Gérant : G. MASSON.

